



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Il nucleolo: un target emergente per la terapia del cancro

Relatore:

Prof. Antonio Lucacchini

Candidato:

Davide Pizzuto

Correlatore:

Prof. Gino Giannaccini

Anno Accademico 2013/2014

Ai miei genitori

INDICE

CAPITOLO 1	5
1.1 Struttura del nucleolo	5
1.2 Il nucleolo e il ciclo cellulare	7
1.3 Il nucleolo plurifunzionale	9
1.4 Oncosoppressore p53	11
1.4.1 Stress nucleolare	13
1.4.2 NPM1-p14ARF-MDM2	17
1.5 Altre vie di regolazione della trascrizione del rDNA	18
 CAPITOLO 2	 21
2.1 Cambiamenti nucleolari come conseguenza del cancro	21
2.2 Carcinoma epatocellulare (HCC)	22
2.3 Alterazione della biogenesi del ribosoma come causa del cancro	25
 CAPITOLO 3	 31
3.1 Dimensioni e funzioni nucleolari nelle cellule tumorali	31
3.2 Risultati sperimentali	33
3.3 Discussione	38
3.4 Proteine nucleolari: biomarcatori	41
 CAPITOLO 4	 44
4.1 Terapia del cancro	44
4.2 Antibiotici	45
4.3 Agenti intercalanti nel DNA	48

4.4 Inibitori della RNA polimerasi I	52
4.5 Altre classi di molecole	56
4.6 Discussione	63
 CONCLUSIONI	 65
 BIBLIOGRAFIA	 68

CAPITOLO 1

1.1 Struttura nucleolo

Più di 200 anni fa l'invenzione del microscopio ottico ha portato alla scoperta che le cellule non sono entità fisse ma dinamicamente soggette a stimoli ambientali. Ciò venne dimostrato osservando la principale parte interna al nucleo, il nucleolo, la quale si smonta e si riassembla nel corso del ciclo cellulare. La maggior parte delle cellule di mammifero contiene da 1 a 5 nucleoli, ciascuno con un diametro compreso tra 0,5 e 5,0 μm , assemblati attorno ad un gruppo di geni ribosomali ripetuti in tandem ("rDNA genes", approssimativamente 250 copie/cellula), trascritti dall'RNA polimerasi I in rRNA e successivamente assemblati in particelle pre-ribosomali. Il nucleolo può essere descritto come una struttura dinamica-non legata alla membrana sub-nucleare, la cui funzione più ampiamente studiata riguarda la biogenesi ribosomale. Anche se i nucleoli non sono organelli legati alla membrana, si racchiudono in tre regioni distinte: il centro fibrillare di colore pallido (FC) che appare come una struttura arrotondata di diversa grandezza, circondata da una componente fibrillare compatta e densa (DFC), composta da densi e fitti fibrilli, che a sua volta è racchiusa in un compartimento esterno granulare (GC) costituito da granuli. Queste regioni possono anche essere definite in base alle loro proteine o RNA ad esse affiliate, e anche in base ai loro processi di funzionamento interni. La produzione del rRNA richiede la formazione di un complesso di pre-iniziazione valido (PIC) - comprendente i fattori regolatori UBF, RRN3 e il complesso selettivo (SL-1) - il promotore dei geni rDNA attivi, e la successiva trascrizione da parte della RNA polimerasi I (Pol I) del precursore ribosomale 47S RNA (rRNA), successivamente elaborato in 28S, 18S e 5.8S RNA. Questi elementi sono concentrati

al confine della FC e DFC. Il 47S rRNA precursore di nuova sintesi è ampiamente elaborato dallo splicing e dalla modificazione post-traduzionale; la prima fase di questi processi si verifica nel DFC, le fasi successive nel GC periferico. Il GC contiene il 5S rRNA, sintetizzato dalla RNA polimerasi III (Pol III) e numerose proteine ribosomali (RPs) codificate dai geni trascritti dalla RNA polimerasi II (Pol II), che insieme agli rRNA maturi detti prima sono poi assemblati all'interno del nucleolo in sottounità ribosomali 40S e 60S, prima di essere esportate nel citoplasma. Questo processo può essere studiato indirettamente monitorando la trascrizione del RNA ribosomale (rRNA) da parte della RNA polimerasi I, che è legata alla natura transitoria del nucleolo. Nelle immagini microscopiche, il nucleolo diventa prima visibile alla fine della mitosi durante la telofase. Non appena le cellule entrano in interfase (fase di crescita delle cellule tra divisioni cellulari), ha luogo la formazione di corpi pre-nucleolari (PNBs) e lo spostamento sia della trascrizione sia dei meccanismi per l'elaborazione verso le regioni organizzatrici del nucleolo assemblate (NORs). Questa attività, che aumenta durante la fase G1 iniziale, porta a far sì che molteplici nucleoli si fondano in un unico nucleolo man mano che il ciclo cellulare progredisce. Il nucleolo si disgrega durante l'inizio della divisione cellulare, in profase, e non viene rilevato nuovamente fino alla fine della mitosi in telofase (Figura 1).

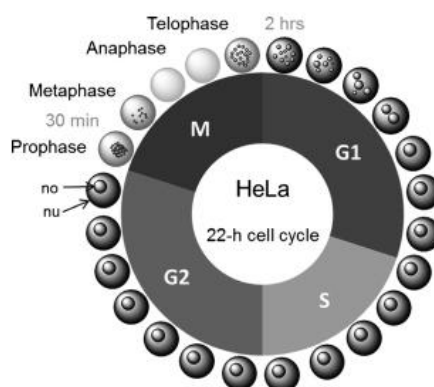


Figura 1

1.2 Il nucleolo e il ciclo cellulare

Il nucleolo e le proteine ad esso associate sono anche implicate nella regolazione del ciclo cellulare, infatti durante l'interfase, nella maggior parte delle cellule eucariote, il numero dei nucleoli varia dipendentemente dalla fase del ciclo cellulare e inoltre, essi scompaiono durante la mitosi.

Il ciclo cellulare si articola principalmente in quattro fasi: nel corso della prim

impegnativa dal punto di vis

di DNA 4N), in cui si ha il controllo quantitativo e qualitativo dell'avvenuta duplicazione del DNA e vengono prodotte proteine attive nella successiva mitosi (fase M, composta a sua volta da profase, metafase, anafase, telofase e citochinesi).

caratterizzata da numerosi eventi che si susseguono in maniera estremamente ordinata, grazie ad elaborati meccanismi di regolazione che ne controllano l'

svolto dalla fosforilazione e defosforilazione di substrati proteici da parte di specifiche chinasi (tra cui, soprattutto, le serina-treonina chinasi ciclina-dipendenti, o cdk) e a tale riguardo, vi sono dati che avvalorano l'ipotesi di un diretto coinvolgimento del nucleolo mediante il sequestro, in sede nucleolare, di specifiche proteine in modo tale da renderle disponibili solo durante precise fasi del ciclo cellulare. Ad esempio, la trascrizione dell' massima durante la fase S e G2/M, silente durante la mitosi e debolmente riavviata in fase G1. Q

modulare la trascrizione dei geni ribosomiali durante il ciclo cellulare.

L'

catalitiche cdk si legano a specifiche proteine a funzione regolatoria denominate cicline (A, B, D ed E), per formare un complesso attivo ciclina-cdk. La formazione, l'attivazione ed il disassemblaggio del complesso ciclina-cdk rappresentano gli eventi pilota che guidano la cellula attraverso il ciclo cellulare, compresi i relativi punti di regolazione o "restriction points

di proseguire alla successiva fase del ciclo cellulare.

Per quel che riguarda, in particolare, gli eventi salienti che caratterizzano la fase G1 e la transizione G1 come l'eventuale ruolo del nucleolo nei suddetti periodi, occorre innanzitutto ricordare che le cicline e relative chinasi coinvolte sono la D (con le chinasi cdk 4 e 6) e la E (con cdk2), quest'ultima implicata soprattutto nel passaggio alla fase S. Bersagli noti ed importanti delle chinasi cdk G1-specifiche sono la famiglia di proteine multifunzionali soppressori tumorali appartenenti al gruppo "retinoblastoma" (Rb), quali pRb, p107 e p130, che fungono da regolatori negativi del complesso eterodimerico di fattori di trascrizione E2F-DP. Nello specifico, il gruppo di protein

inattivo, mentre

la iperfosforilazione di Rb (che avviene in tarda fase G1 principalmente ad opera di cdk 2, 4 e 6) porta al rilascio di E2F (nella forma di eterodimero E2F-DP), che a sua volta agisce attivando la trascrizione di geni che codificano per le proteine a funzione enzimatica da utilizzare in fase S, quali DNA polimerasi alf

di legame con il DNA e di reg

dei fattori di trascrizione E2F-DP, fino
alla iperfosforilazione della stessa ad opera di specifiche chinasi. D'altra parte, la forma
iperfosforilata di Rb sembra interagire con B23 (nucleofosmina), un'
nuovamente sequestrata e

elevata
sintesi di rRNA ed alla proliferazione cellulare noto come i livelli di
trascrizione di rDNA aumentino durante la fase G1 e come la sintesi di rRNA sia
principalmente mediata anche dalla fosforilazione (in particolare ad opera di cdk4-
ciclina D1 e cdk2-ciclina E) dei fattori di trascrizione che modulano l'
dell'enzima RNA polimerasi I, quali UBF. A tale proposito, studi in vitro hanno anche
dimostrato un'interazione tra la forma ipofosforilata di Rb e UBF e conseguente
abrogazione dell' trascrizionale della RNA polimerasi I.

1.3 Il nucleolo plurifunzionale

Si è pensato che la funzione principale del nucleolo fosse limitata alla produzione delle
subunità ribosomali. Comunque, diversamente dal classico punto di vista, nel 1998,
Pederson ha proposto il nuovo concetto di un nucleolo plurifunzionale basato su studi
che dimostravano che esso svolgeva altre funzioni cellulari, per esempio, la produzione

e/o la fuoriuscita del sottoinsieme degli mRNA, della particella di riconoscimento del segnale degli RNA (SRP), e del tRNA. Questa ipotesi ora viene sostenuta dall'analisi proteomica più recente che riporta oltre 4500 proteine associate con il nucleolo dei quali solo circa il 30% sono direttamente coinvolti nella sintesi ribosomale. Questi studi collegano il nucleolo alla biogenesi di certi complessi di ribonucleoproteine non ribosomali, alla regolazione del ciclo cellulare, alla replicazione e alla riparazione del DNA, all'infezione virale, alla segnalazione dello stress, alla regolazione del soppressore tumorale e delle attività proto-oncogeniche, alla sopravvivenza cellulare e all'induzione dell'apoptosi. Un meccanismo proposto tramite il quale il nucleolo può indirettamente regolare diverse funzioni cellulari è attraverso il sequestro e il rilascio delle proteine chiave regolatrici per questi processi. Per esempio, il sequestro nel nucleolo di importanti proteine e oncoproteine repressive tumorali, come alternative reading frame(ARF, mouse p 19ARF, human p14ARF), nucleofosmina (NPM1), e MDM2 (mouse double minute2), almeno in parte, regola la loro funzione modulando la via di p53. Sorprendentemente, l'integrità nucleolare è strettamente collegata all'attivazione della via di p53 poiché varie forme di stress cellulare mediano l'aumento di stabilità di p53 e alterano l'integrità nucleolare. Per esempio, l'induzione di danni al DNA tramite i raggi UV causa una stabilizzazione di p53 e una divisione nucleolare, caratterizzata dalla separazione in subcompartimenti nucleolari e la formazione di strutture "cap". Inoltre, il danno al DNA da radiazioni ionizzanti, favorisce la stabilizzazione di p53 e causa un disturbo nucleolare, anziché la separazione. In uno studio di riferimento condotto da Rubbi e Milner, la stabilizzazione e l'attivazione della via p53 attraverso il danno nucleare al DNA, richiedeva un disturbo nucleolare. In particolare, studi proteomici "di spazio", usando la spettrometria di massa quantitativa in combinazione con un imaging dinamico, hanno rivelato una riorganizzazione

complessa del nucleolo e una regolazione dinamica del suo contenuto proteico. Ciò è stato osservato in risposta al ciclo cellulare e a vari danni, incluso la mancanza di nutrimento, l'inibizione della trascrizione della Pol I e II per mezzo di actinomicina D, l'infezione virale, l'alterazione della produzione dell'rRNA, lo squilibrio dell'RP, i difetti nell'assemblaggio della subunità ribosomale, e il trattamento con agenti danneggianti del DNA. Nel loro insieme, queste osservazioni suggeriscono che il nucleolo è un organello molto complesso e specifico nella rilevazione dello stress, e che esso risponde a vari disturbi cellulari in un modo unico e singolare, eseguendo risposte antiproliferative, incluso l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. Questi studi forniscono dunque una prova convincente che un proteoma nucleolare altamente dinamico integra vari segnali, e ci fanno riflettere su come possano essere coordinati la riorganizzazione nucleolare e il meccanismo tramite il quale è attivato p53 in risposta a stimoli di stress variabili.

1.4 Oncosoppressore P53

All'oncosoppressore p53 viene assegnato il titolo di "guardiano del genoma", grazie al suo ruolo di mediatore chiave di risposte che segnalano condizioni di stress, tra cui l'arresto del ciclo cellulare, la senescenza e l'apoptosi. Allo stesso tempo, p53 muta in circa la metà di tutti i tumori umani, e nella maggior parte dei rimanenti tumori che esprimono il *wild-type* p53 la sua funzione è compromessa. p53 inibisce direttamente la trascrizione della Pol I legandosi alla TATA box-binding protein (TBP) e al fattore 1C associato alla TBP (TAF1C) i quali sono componenti del complesso SL-1. Questa interazione in seguito previene il reclutamento di SL-1 che deve attaccarsi al complesso

UBF, impedendo così la formazione del PIC (figura 2). Inoltre, i bersagli che segnalano lo stress p53-dipendente regolano anche negativamente la trascrizione della Pol I, inclusa l'attivazione di pRb, o la repressione di MYC.

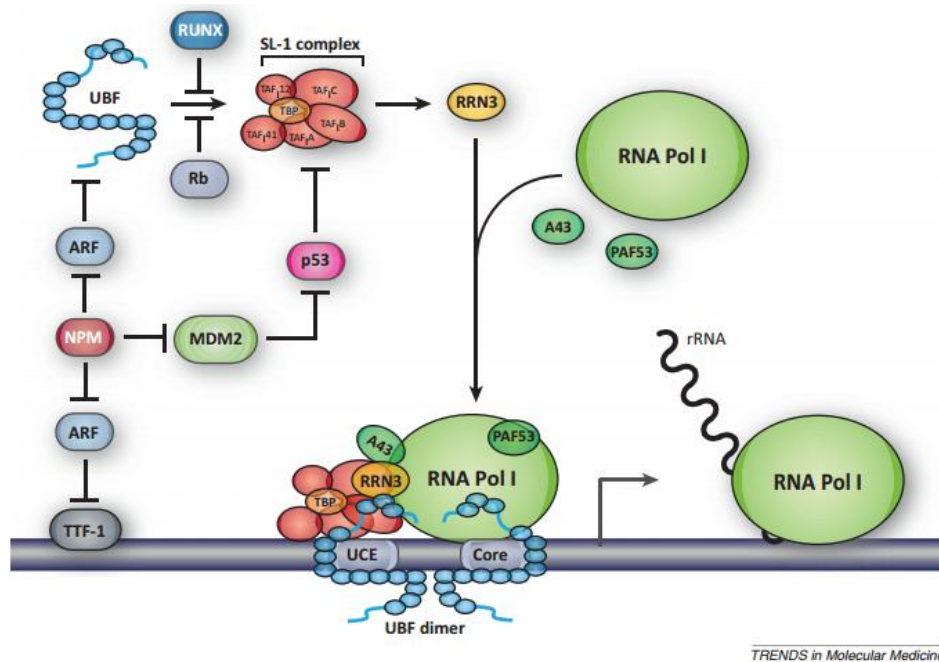


Figura 2

Una funzione chiave del nucleolo legata al cancro è il suo ruolo nella regolazione del soppressore tumorale p53. Solitamente la proteina p53 è mantenuta a livelli basali nella cellula da MDM2, che inibisce l'attività di p53 mediante due meccanismi: i) ubiquitinazione, che la porta ad una degradazione proteasomica e ii) vincolo diretto, che inibisce la sua attività di transattivazione. Al fine di stabilizzare e attivare, p53 deve essere rilasciata dall'associazione inibitrice con MDM2. Inoltre, la modificazione post-traduzionale e le associazioni con co-fattori, mediano l'attività di p53 nei confronti dei suoi bersagli trascrizionali. E' ormai chiaro che l'attivazione di p53 e la sua funzione di soppressore tumorale è mediata, in parte, dal nucleolo. Questo risultato si ottiene

attraverso molteplici meccanismi, tra cui i percorsi di stress nucleolare e l'asse NPM1-MDM2-p14ARF.

1.4.1 Stress nucleolare

Una delle vie chiave che coinvolge il nucleolo è la “via di stress nucleolare” innescata attraverso il disturbo della sintesi ribosomale e il successivo sconvolgimento dell'integrità nucleolare. L'evento chiave a valle di questo processo è la modulazione della oncoproteina MDM2, che reprime p53, un regolatore chiave nell'apoptosi indotta dallo stress, riparazione del dna, arresto del ciclo cellulare, e invecchiamento. MDM2 media il suo effetto su p53 attraverso 2 meccanismi distinti: 1) l'MDM2 si lega direttamente al p53 impedendo la sua interazione con il complesso di trascrizione della Pol I e quindi la sua capacità di transattivazione; 2) l'MDM2 modifica la stabilità di p53 attraverso la sua attività E3 ubiquitina ligasi e quindi punta a p53 per la fuoriuscita nucleare e la degradazione proteosomale del 26S.

La comprensione del legame meccanico tra lo stress nucleolare e p53 è stato lentamente svelato durante gli ultimi venti anni, con la proposta di un numero di meccanismi che non si escludono a vicenda. I primi studi suggerirono che RPL5 in aggiunta al suo ruolo nella fuoriuscita nucleare del 5S rRNA, si associa con l'MDM2 e previene la sua interazione con p53, ottenendo come risultato un accumulo di p53. Studi più attuali propongono che, in condizioni fisiologiche normali, il complesso p53/MDM2 viene coesportato con componenti ribosomali verso il citoplasma, causando la degradazione proteosomale di p53, che, in condizioni di stress nucleolare, si accumula

nel nucleolo a causa dell'esportazione del complesso. Comunque, il modello di cui si possiedono dati più consistenti propone che il disturbo nucleolare media il rilascio di un sottoinsieme di RP e rRNA nel nucleoplasma, incluso RPL5, RPL11, RPL23, RPS3, RPS7 e gli rRNA 5S e 5,8S. Questo sottoinsieme di elementi nucleolari si lega direttamente all'MDM2 rilasciando così p53, eliminando di conseguenza l'ubiquitinazione di p53 e la degradazione proteosomale. Studi più recenti suggeriscono inoltre che RPL11 e RPL5 (più probabilmente in un complesso con 5S rRNA) potrebbero essere gli RP predominanti nel provocare una risposta di p53 attraverso il sequestro di MDM2 e che l'effetto di altri RP sull'induzione di p53 potrebbero essere largamente mediati attraverso l'inibizione della traduzione globale. Curiosamente nel contesto dello stress nucleolare, p53 sembra far parte di un circuito feed-forward positivo. L'analisi proteomica dello stress nucleolare nelle cellule HCT11, con o senza p53, suggerisce che p53 è in realtà necessario per il rilascio iniziale degli RP dal nucleolo a seguito di traumi che inibiscono la sintesi dell'rRNA.

In seguito ad ulteriori studi il modello dello stress nucleolare sta diventando sempre più complesso a causa dell'identificazione di nuovi componenti in questo processo. MDM4 (una proteina legata a MDM2 che inibisce p53 legando il suo dominio di attivazione trascrizionale e interagisce anche con MDM2 inibendo la sua degradazione) è stato recentemente considerato, migliorando la soppressione di MDM2 mediata da RPS7, lui stesso un bersaglio di MDM2 mediato dalla degradazione ubiquitina dipendente. Similmente, PICT1 (anche conosciuto come GLTSCR2) sequestra l'RPL11 nel nucleolo in condizioni fisiologiche normali, prevenendo così il legame inibitorio di RPL11 ad MDM2, e ottenendo come risultato un accumulo di p53. L'accumulo di p53

nelle cellule staminali embrionali carenti di PICT1, anche in assenza di danni al DNA, promuove l'arresto del ciclo cellulare G1 e l'apoptosi. Inoltre, la perdita di PICT1 è legata all'inibizione della progressione tumorale in un modello di cancro della pelle chimicamente indotto.

Curiosamente altri studi riportano che lo stress nucleolare induceva l'accumulo di p53 indipendentemente dall'attività di legame con MDM2, sebbene questo fosse ancora attribuito alla funzione RP. In risposta ai danni al DNA, RPL26 si lega alla regione 5' non tradotta del p53 mRNA, potenziando la sua traduzione, portando all'arresto del ciclo cellulare G1 p53 dipendente. Al contrario il legame di MDM2 al RPL26 spinge alla poliubiquitinazione e alla degradazione proteosomale e allo stesso tempo attenua l'associazione del RPL26 con il p53 mRNA, così reprimendo l'aumento RPL26 mediato della sintesi della proteina p53 (figura 3).

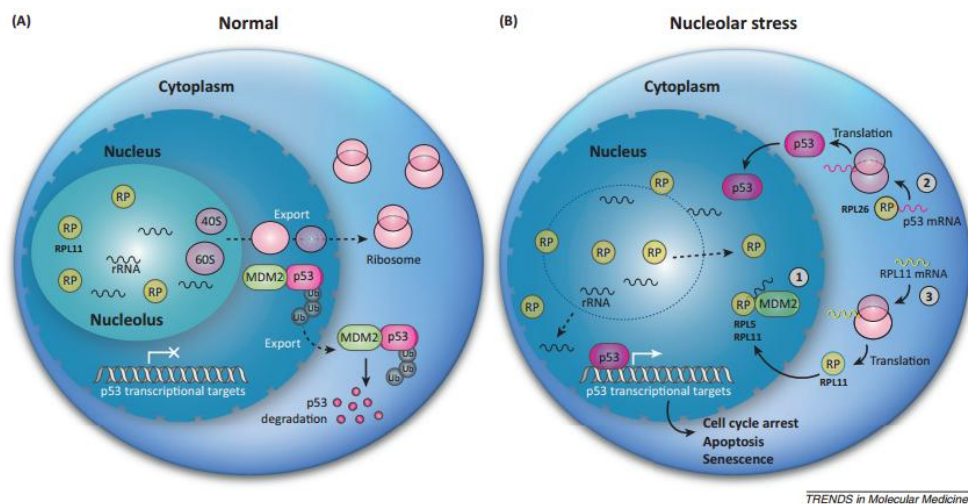


Figura 3

Quindi, l'interazione MDM2-RPL26 rappresenta una componente del circuito di feedback auto regolatore che modula i livelli e le attività cellulari del p53. Oltre all'ubiquitinazione, è stato riferito che altre modifiche post-traduzionali hanno avuto un impatto sulla localizzazione delle proteine nucleolari mediate dallo stress nucleolare. Per esempio, le modifiche post-traduzionali del RPL11 tramite neddilazione (NEDDylation) con NEDD8 (molecola simile all'ubiquitina), essenziale per la sua stabilità e localizzazione nucleolare, viene eliminata in risposta allo stress nucleolare.

L'idea che lo sconvolgimento dell'integrità nucleolare è una fase obbligatoria per l'induzione di stress nucleolare di p53 non è molto precisa. La sintesi della subunità 40s danneggiata in risposta alla riduzione del RPS6 induce un accumulo di p53, in mancanza di uno sconvolgimento nucleolare visibile. In questo caso, la traduzione del terminale 5' mediata dalle oligopirimidine era incrementata, portando all'accumulo dell'RPL11 nel nucleoplasma e favorendo la stabilizzazione di p53, anche quando la traduzione globale era ridotta. Infatti, è stato suggerito che la via dello stress nucleolare potrebbe essere più correttamente chiamata "percorso di controllo della biogenesi ribosomale" per descrivere un modello nel quale esiste un equilibrio dinamico nella cellula, che accoppia la biogenesi ribosomale continua alla stabilità della proteina p53, in modo tale che il complesso RPL5/RPL11/5s rRNA è o incorporato nei ribosomi nascenti oppure legato a MDM2. Quindi, la biogenesi del ribosoma danneggiato non solo si comporterebbe come un innesco per indurre il p53 ma si comporterebbe anche come un regolatore omeostatico in cellule normali, strettamente collegando la produzione di ribosomi appena sintetizzati con i livelli di p53. In definitiva, vale la pena notare che lo stress nucleolare e l'eliminazione della biogenesi ribosomale può

probabilmente innescare punti di controllo oltre al p53. Esaurimento contemporaneo di RP essenziali, uno da ogni subunità, ma non la stessa, porta a un incremento dell'induzione di p53 che non solo è associato a un blocco p53 dipendente in G1 ma anche a un arresto nuovo del G2/M.

1.4.2 NPM1-p14ARF-MDM2

La proteina nucleolare p14ARF lega MDM2 e inibisce la sua attività nei confronti di p53. In condizioni normali p14ARF viene mantenuta a bassi livelli di degradazione ubiquitina-mediata, tuttavia è trascrizionalmente regolata e stabilizzata dalla proteina nucleolare nucleofosmina (NPM1) in risposta ad una varietà di segnali, in particolare oncogenici o di stress genotossico. NPM1 conosciuta anche come B23, o NO38, è sovraespressa in vari tumori solidi e ripetutamente traslocata nella leucemia mieloide acuta (AML). Sebbene inizialmente si era visto che NPM1 era interessata nella biogenesi ribosomale, la sua descrizione più attuale è come trasportatore tra il nucleolo, nucleoplasma e citoplasma, dove interagisce direttamente con numerose proteine, incluse le proteine nucleolari, nucleostemina e nucleolina, come anche MYC, ARF, p52, e MDM2. Quindi, NPM1 ora è associata ad un'ampia gamma di processi cellulari oltre che alla biogenesi ribosomale, incluso la riparazione del DNA, l'autoriparazione, la duplicazione centrosoma, la proliferazione, e la risposta allo stress.

La funzione di p14ARF è come regolatore chiave di p53, con la conseguente stabilizzazione di p53 e la sua attivazione, ma può anche agire indipendentemente da

p53 e indurre l'arresto del ciclo cellulare o l'apoptosi. La perdita di p14ARF è quasi comune come la perdita di p53, le quali entrambe si verificano in circa il 40% dei tumori umani. ARF può reprimere direttamente il percorso della trascrizione della Pol I alterando la fosforilazione UBF e quindi la sua capacità di reclutare il PIC, e prevenire l'importo nucleolare del fattore di terminazione della trascrizione della Pol I (TTF-1).

La localizzazione nucleolare media il percorso NPM1-p14ARF-MDM2-p53 in due modi: i) traslocazione di NPM1 dal nucleolo al nucleoplasma che promuove l'interazione di p14ARF con MDM2, interrompendo così l'associazione di MDM2 con p53 e la successiva degradazione di p53, ii) una maggiore localizzazione nucleolare di p14ARF può portare alla sua ulteriore stabilizzazione, impedendo la sua degradazione, così come potenzialmente può sequestrare MDM2 da p53.

1.5 Altre vie di regolazione della trascrizione del rDNA

MYC

Il fattore di trascrizione MYC (prodotto di thec-MYConcogene) è una delle oncoproteine attivate più di frequente, iperespressa in ~ 50% di tutti i tumori. MYC regola la trascrizione di un grande gruppo di geni, in particolare quelli che guidano la crescita delle cellule, inclusi i fattori chiave coinvolti nella biogenesi ribosomale e sintesi proteica. MYC modula la trascrizione della Pol I in diversi modi: fa aumentare la trascrizione delle subunità centrali della Pol I e dei fattori di trascrizione (come UBF e RRN3); mentre si associa direttamente con SL-1 per stabilizzare il complesso UBF/SL1, e si lega al rDNA per promuovere reclutamento della Pol I. Inoltre, MYC promuove la trascrizione di alcuni fattori richiesti per la maturazione rRNA e il suo assemblaggio, 5S rRNA da Pol III, dei geni RP di Pol II. Così, MYC agisce come regolatore fondamentale nella biogenesi dei ribosomi. (figura 4)

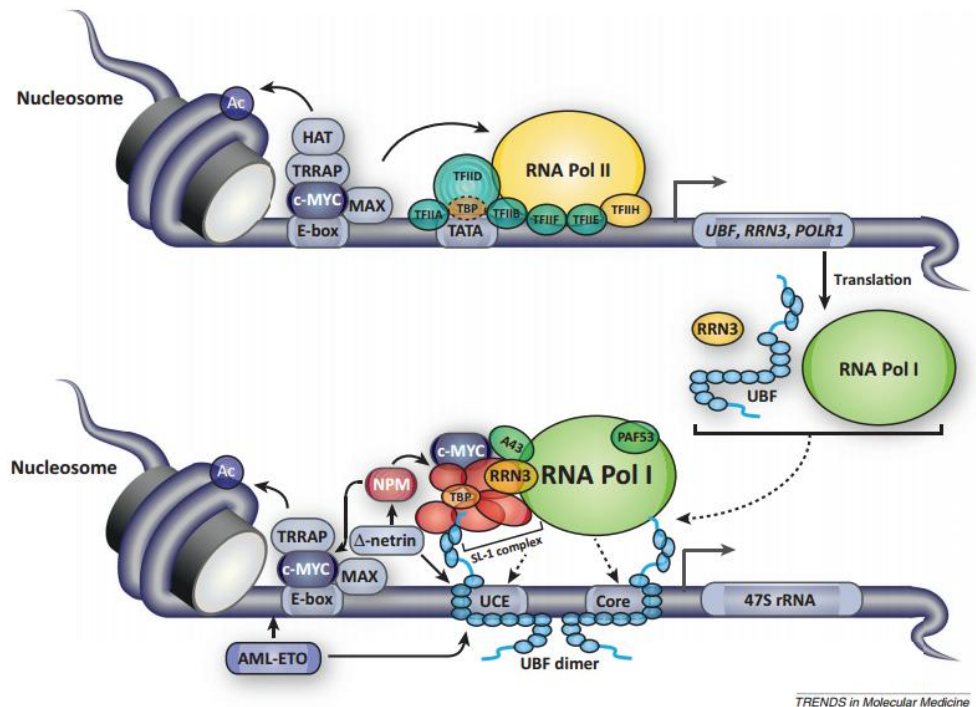
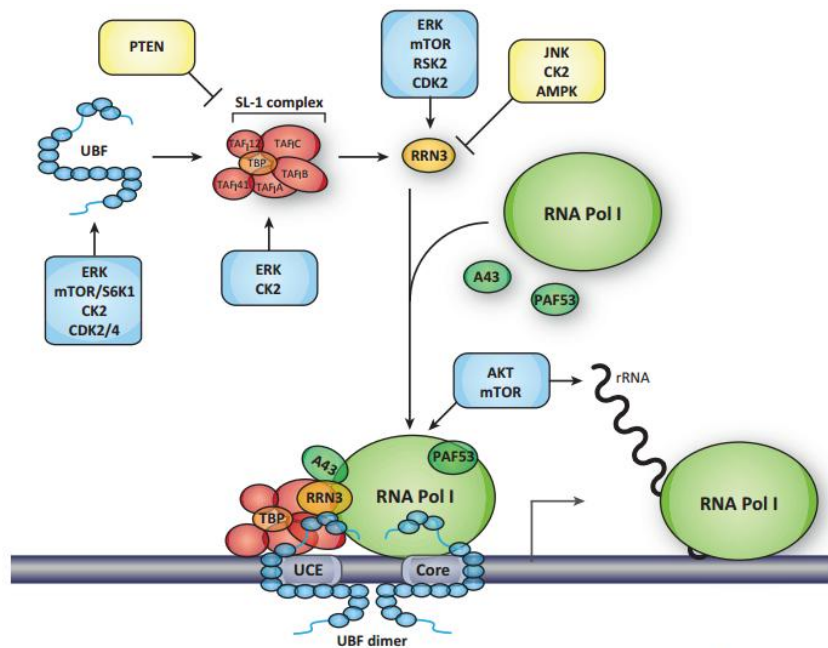


Figura 4

I percorsi RAS/RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR

I principali percorsi regolatori di crescita e nutrimento conosciuti per modulare la trascrizione da parte della Pol I sono la RAS / RAF / MEK / ERK e PI3K / AKT / cascate di segnalazione mTOR. La via RAS / RAF / MEK / ERK può regolare la trascrizione della Pol I tramite diverse chinasi, tra cui ERK, MAPK, RSK2, e JNK. Ad esempio, ERK fosforila direttamente, e quindi attiva: 1) UBF per aumentare l'allungamento della trascrizione Pol I; 2) RRN3 che promuove l'iniziazione della Pol I. Componenti della via PI3K / AKT / mTOR/S6K modulano l'attività di Pol I attraverso, ad esempio: proteina ribosomiale S6 chinasi (S6K), che modula indirettamente UBF e la

fosforilazione di RRN3, migliorando così la trascrizione di Pol I ; PTEN, un regolatore negativo PI3K/AKT/mTOR, che reprime la trascrizione Pol I promuovendo la dissociazione del complesso SL-1; o AKT, che è in grado di attivare la trascrizione della Pol I a più livelli. Inoltre, entrambi i percorsi cooperano con MYC: ERK stabilizza MYC mediante la fosforilazione , mentre AKT collabora con MYC per attivare la trascrizione di Pol I. Numerosi componenti di queste cascate di segnalazione agiscono come oncoproteine, amplificando la segnalazione proliferativa del loro rispettivo percorso. Ad esempio, RAS e RAF sono rispettivamente mutati nel 30% e nel 6-7% dei tumori umani. L'espressione di PTEN è ridotta in una serie di tumori, che ha come risultato una maggiore segnalazione di PI3K. Nel percorso stesso di PI3K, la sottunità catalitica PIK3CA di PI3K è più comunemente segnalata per essere amplificata o mutata, mentre per un sottoinsieme più piccolo di tumori altre molecole, tra cui AKT, 4EBP1, eIF4E, Rheb e S6K1 sono sovraesprese e / o iperattivate.(figura 5)



TRENDS in Molecular Medicine

Figura 5

CAPITOLO 2

2.1 Cambiamenti nucleolari come conseguenza del cancro.

Sono stati analizzati i cambiamenti nucleolari in praticamente tutti i tumori umani ed è stato possibile evincere che sono estremamente variabili e indipendenti dall'istogenesi dei tumori, come avviene all'interno dello stesso campione tumorale. E' interessante come, anche se l'ipertrofia nucleolare e la upregulation funzionale del nucleolo solitamente caratterizzano le cellule cancerose, questi studi dimostrino come ciò non corrisponda sempre alla realtà: la grandezza nucleolare e l'attività funzionale sono spesso più basse rispetto a quelle delle cellule normali. Infatti, i cambiamenti nucleolari nei tumori sono strettamente legati al numero delle cellule riprodotte all'interno dei tessuti tumorali e alla rapidità di proliferazione del ciclo cellulare, e ai parametri cinetici che sono estremamente variabili nei tumori umani e che spesso hanno valori più bassi rispetto alla proliferazione nei tessuti normali. Ora è chiaro che la upregulation della funzione nucleolare che si verifica nella proliferazione delle cellule è attribuibile ai prodotti dello stesso proto-oncogene e ai geni soppressori tumorali che controllano la proliferazione delle cellule.

Alcuni cambiamenti, dei proto-oncogeni e dei soppressori tumorali, si verificano di frequente in un ampio numero di tumori umani, i quali sono responsabili non solo della perdita del normale meccanismo di controllo della proliferazione delle cellule e del ciclo di progressione cellulare, ma anche dell'aumento della biogenesi dei ribosomi. cMYC può essere sovraespresso in diverse neoplasie ematologiche e altri tumori, e aumenta direttamente l'attività di trascrizione della RNA polimerasi I legando specifici

elementi consenso al rDNA e reclutando il fattore SL1 al promotore del rDNA. Comunque, tra i cambiamenti apportati dalle trasformazioni neoplastiche che sono di grande importanza sia per l'alta frequenza con cui si verificano sia per gli effetti che hanno sulla biogenesi dei ribosomi, quelli che coinvolgono la proteina retinoblastoma soppressore tumorale pRb e il percorso di p53, sono senza dubbio i più rilevanti. Sulla base dei meccanismi, descritti nel capitolo primo, con cui questi soppressori tumorali regolano la biogenesi del ribosoma e la proliferazione cellulare è possibile dire che il grado di ipertrofia nucleolare è direttamente collegato alle alterazioni dei percorsi di p53 e pRb. La distruzione dei percorsi di p53 e pRb provoca un'instabilità genetica nelle cellule tumorali che colpisce una serie di processi i quali portano ad un aumento dell'aggressività biologica del cancro, e da un punto di vista clinico, a delle prognosi maligne. Poiché la disattivazione di p53 e pRb è anche responsabile della regolazione positiva della biogenesi del ribosoma, la presenza di nucleoli molto dilatati nei tessuti cancerosi è spesso associata a un risultato clinico infausto, dato che l'ipertrofia nucleolare è un prezioso parametro per le patologie tumorali.

I dati dimostrano che la regolazione della biogenesi dei ribosomi e i conseguenti cambiamenti nucleolari nelle cellule tumorali, sono la conseguenza di cambiamenti funzionali di quelle proteine oncogene e tumorali che fungono da soppressori e che controllano la proliferazione cellulare, spiegando l'alta variabilità dei cambiamenti nucleolari nel cancro.

2.2 Carcinoma epatocellulare (HCC)

Circa la relazione tra il nucleolo e il cancro, i risultati riportati nella sezione precedente indicano che i cambiamenti nucleolari nelle cellule tumorali possono essere considerati semplicemente come rappresentanti di un adattamento del nucleolo alle nuove

caratteristiche funzionali acquisite dalle cellule trasformate. Ad ogni modo, ciò evidenzia anche un ruolo attivo del nucleolo nel cancro. Diverse lesioni non tumorali dei tessuti umani sono caratterizzate da un crescente rischio di trasformazione neoplastica. Tra queste, la patologia cronica al fegato, causata da epatiti virali, dall'abuso d'alcool, e da errori metabolici congeniti, è una tra le più importanti e tra le più diffuse condizioni associate allo sviluppo del cancro. L'otto per cento dei carcinomi epatocellulari (HCCs) si manifestano sempre quando la patologia del fegato cronica raggiunge lo stato di cirrosi. I meccanismi che caratterizzano lo sviluppo di HCC nella suddetta patologia sono stati studiati facendo particolare attenzione al ruolo delle alterazioni genetiche che hanno luogo durante il processo di epatocarcinogenesi. Questi studi non hanno evidenziato un profilo comune dei cambiamenti genetici che avrebbero portato a definire un percorso comune di trasformazione neoplastica. Infatti, l'analisi relativa all'espressione dei geni mostra che ciascuno HCC è caratterizzato da un proprio profilo di cambiamenti genetici unico e specifico.

E' interessante notare che, per ciò che concerne i disturbi cronici al fegato provocati da infezioni virali, una up-regulation della biogenesi del ribosoma negli epatociti è puntualmente associata alla successiva comparsa di HCC. E' stato dimostrato che sia il virus dell'epatite B (HBV), che quello dell'epatite C (HCV), i quali sono responsabili dello sviluppo di disturbi cronici al fegato, regolano l'attività delle RNA polimerasi I e III. La proteina X del HBV, necessaria alle replicazioni virali e legata alla epatocarcinogenesi di infezioni croniche provocate dal HBV, modula la trascrizione del rRNA dipendente dalla RNA polimerasi I, aumentando l'attività promotrice di rRNA e attivando promotori specifici dipendenti dalla RNA polimerasi III. La proteina nucleare del HCV, implicata nel controllo della crescita delle cellule e della loro proliferazione, aumenta la richiesta di UBF e di RNA polimerasi I verso il promotore rRNA, e coopera

all'attivazione della trascrizione RNA polimerasi III-dipendente. In accordo a tali scoperte, si pensa che l'aumento della produzione dei ribosomi indotto da queste proteine virali può giocare un ruolo importante nel corso della tumorigenesi sostenendo un tasso di aumento della proliferazione cellulare. Una serie di studi svolti per definire se i cambiamenti nucleolari possono essere collegati a trasformazioni neoplastiche nei disturbi cronici al fegato provocati da infezioni virali, hanno dimostrato che la presenza di nucleoli stranamente dilatati negli epatociti rappresenta un fattore di forte rischio per lo sviluppo di HCC, principalmente in relazione a HBV. In altre parole, solo quelle lesioni croniche dei fegati in cui l'infezione virale induce un'ipertrofia e di conseguenza una up-regulation funzionale dei nucleoli, possono essere suscettibili allo sviluppo del cancro.

Il fatto che la up-regulation della biogenesi dei ribosomi rappresenti un fattore di rischio per lo sviluppo di HCC, non permette di stabilire alcuna relazione causa-effetto. Le proteine HBV e HCV che stimolano l'attività del RNA polimerasi I e III, sono attivatori trascrizionali e modulano anche l'espressione dei geni implicati nel controllo dell'apparato del ciclo cellulare.

Quindi i cambiamenti nucleolari possono essere solo una conseguenza dell'attivazione del ciclo cellulare dei geni ad essi legati. Comunque è bene notare che l'ipertrofia nucleolare, che precede la comparsa del cancro, sembra essere indipendente dalla proliferazione cellulare: infatti la maggior parte degli epatociti caratterizzati dalla presenza di nucleoli dilatati costituiscono focolai displasici in cui non era stata identificata alcuna attività proliferativa. Quindi è probabile che la up-regulation funzionale dei nucleoli può essere necessaria, o almeno facilitare l'incorrere di trasformazioni neoplastiche delle cellule del fegato caratterizzate da disturbi cronici. In

aggiunta, come verrà poi affrontato nella sezione successiva, una produzione crescente di ribosomi, non legati alla divisione cellulare, possono anche alterare i meccanismi di traduzione, provocando diverse variazioni nella sintesi di specifiche proteine che controllano la progressione del ciclo cellulare, favorendo quindi la proliferazione cellulare.

2.3 Alterazioni della biogenesi dei ribosomi come causa del cancro.

Oggigiorno una delle principali questioni che ci si pone è se le alterazioni che hanno luogo in un normale processo di produzione dei ribosomi possono indurre, o possono contribuire, ad una trasformazione neoplastica. Un difetto nella biogenesi del ribosoma può generare dei ribosomi dotati di una capacità intrinseca di trasformazione alterata, colpendo quindi le proteine che giocano un ruolo fondamentale nella progressione e nella trasformazione neoplastica. L'intero ribosoma è costituito da quasi 7000 nucleotidi a RNA in lunghezza (200 dei quali sono modificati) assemblati con almeno 82 proteine differenti. Dunque, un insieme di possibili modificazioni possono alterare una così complessa struttura a livelli differenti.

Un'ipotesi così interessante può essere utilizzata per spiegare cosa succede in una rara sindrome ereditaria chiamata discheratosi congenita legata a X (DC) attribuibile alla mutazione del gene DKC1. DC è caratterizzata da una insufficienza della pelle, della mucosa e del midollo osseo associata all'aumento di rischio di sviluppo tumorale. Il prodotto di DKC1, la discherina, è una proteina nucleolare che ha almeno due differenti funzioni principali. Per prima cosa la discherina è una componente di alcune piccole particelle nucleolari ribonucleoproteiche (snoRNPs), coinvolte nel processo di rRNA. In particolare la discherina è necessaria per la conversione sito specifica dei residui di uridina nel RNA in pseudouridina. In secondo luogo la discherina lega il componente

RNA della telomerasi stabilizzando il complesso enzimatico della telomerasi. Quindi le alterazioni della discherina causano difetti della biogenesi del ribosoma, come la riduzione della pseudouridilazione del RNA e il rallentamento del processo di elaborazione del rRNA del ribosoma, e causano difetti della funzione della telomerasi attribuibile alla degradazione del componente RNA della telomerasi che provoca il danneggiamento dell'attività enzimatica del complesso telomerasico e il progressivo accorciamento dei telomeri nelle cellule riprodotte.

Studi recenti hanno cercato di indirizzare la funzione della discherina la quale, una volta persa, contribuisce alla formazione di tumori. La perdita della funzione della telomerasi può portare ad un aumento di probabilità di cancro, come è stato osservato nei topi a cui mancava l'attività telomerasica a causa della scomparsa del componente RNA della telomerasi. In questo caso il logoramento dei telomeri porta ad una crescita nell'incidenza dei tumori nei topi di ultima generazione, probabilmente a causa di una instabilità dei cromosomi. Dall'altro lato, una crescita di incidenza tumorale è stata riscontrata in un topo ipomorfo in cui DKC1 è mirato, e l'espressione della discherina è ridotta del 30% rispetto ai controlli effettuati sui suoi "fratelli". Questo caso (del suddetto topo), poiché l'eliminazione di DKC1 è letale per gli embrioni, è l'unico disponibile in relazione agli studi in vivo. L'espressione ridotta della discherina causa una riduzione dell'attività telomerasica e della pseudouridilazione del rRNA. E' interessante notare come nel topo ipomorfo DKC1 la crescita dell'incidenza tumorale è anche riscontrata nelle ultime generazioni, dove i telomeri sono ancora molto lunghi. E' stato quindi dedotto che una cattiva pseudouridilazione del rRNA può giocare un ruolo decisivo nella promozione della tumorigenesi. Inoltre nelle cellule appartenenti ai pazienti affetti da DC e nei topi ipomorfi, è stato segnalato un difetto selettivo nella traduzione del gruppo degli mRNA contenenti internal ribosome entry site elements

(IRES). La traduzione delle IRES presenta dei difetti nelle cellule DC nella traduzione di alcuni mRNA, inclusi quelli che codificano il soppressore tumorale p27, come anche i fattori antiapoptici tra cui Bcl-Xl e XIAP. La traduzione difettosa dei soppressori tumorali può favorire l'insorgenza di un fenotipo neoplastico, almeno nei tumori relativi ai pazienti DC. Sarebbe interessante sapere se un difetto del ribosoma può favorire la comparsa di un tumore maligno anche nel resto della popolazione. E' stato infatti dimostrato che l'espressione della discherina è estremamente variabile nei tumori umani di diversa origine istologica, come i tumori al seno, al polmone, al colon, e il linfoma a grandi cellule B. Inoltre nei carcinomi al seno, i livelli di espressione della discherina, sono strettamente legati alle sue funzioni. In particolare un gruppo di tumori caratterizzati da un'espressione della discherina molto bassa mostrano anche una pseudodurilazione difettosa del mRNA. Questi risultati insieme ai dati ottenuti dagli studi sui pazienti DC e sul modello di topo DC, sono compatibili con uno scenario in cui le alterazioni intrinseche del ribosoma a causa del funzionamento difettoso della discherina possono contribuire alla trasformazione neoplastica mediante un meccanismo alterato di traduzione sia nella DC che in un sottoinsieme di tumori umani.

Oltre che nella DC, è evidente che una biogenesi alterata del ribosoma è associata ad un aumento dell'incidenza dei tumori in altri disturbi ereditari. Tra questi l'anemia di Diamond-Blackfan, l'ipoplasia cartilagine capelli e la sindrome Shwachman-Diamond. E' interessante notare come tutti questi disturbi sono caratterizzati da gradi di carenza di midollo osseo come avviene nella DC. Anche se la patogenesi molecolare di questi disturbi è minore rispetto a DC, è noto che la crescita della suscettibilità tumorale è associata a difetti relativi alla biogenesi del ribosoma che possono aver luogo a livelli differenti. Ad esempio nel 25 % di casi familiari e sporadici dell'anemia di Diamond-Blackfan, il difetto del ribosoma era attribuibile alle mutazioni di RPS19, il gene che

codifica la proteina 19 in piccole sottounità. Non è chiaro che specifiche conseguenze abbiano queste mutazioni sulla traduzione del mRNA; ad ogni modo la proteina ribosomale S19 è necessaria per la corretta elaborazione di 18s rRNA e per la maturazione della sottounità 40S. In un altro 2% di casi di anemia di Diamond-Blackfan il difetto del ribosoma era invece attribuibile alle mutazioni di RPS24, gene che codifica la proteina 24 in piccole sottounità. Nell'ipoplasia cartilagine capelli il componente RNA non codificato del complesso ribonucleoproteico RNAase MRP, chiamato RMRP, è mutato. E' stato dimostrato che questo RNA possiede diverse funzioni, inclusa la riproduzione mitocondriale del DNA, la progressione del ciclo cellulare alla fine della mitosi, e l'elaborazione del RNA ribosomale. I cambiamenti descritti nell'ipoplasia cartilagine capelli per prima cosa colpiscono l'elaborazione del 5.8S RNA, che comporta un coinvolgimento del ribosoma nella patogenesi di questo disturbo. Un difetto nell'elaborazione di rRNA sta anche dietro la sindrome Shwachman-Diamond. Studi filogenetici mostrano che attraverso l'evoluzione esso possiede diversi aspetti in comune con un gruppo di proteine coinvolte nel metabolismo di RNA, la traduzione, e la funzione del ribosoma ad esso associata. Inoltre studi recenti hanno dimostrato che la proteina SBDS è localizzata nel nucleolo ed è essenziale per la maturazione in 60S, e per l'attivazione della traduzione dei ribosomi.

E' interessante notare come ci sia almeno un disturbo ereditario aggiuntivo in cui la biogenesi del ribosoma può essere alterata. Infatti le mutazioni del gene Tcof1 sono state riscontrate nella sindrome di Treacher-Collins. Il prodotto del gene Tcof1, chiamato melassa (treacle), è una proteina nucleolare che collega la trascrizione del rRNA alla sua specifica metilazione post-trascrizionale. In questo disturbo, principalmente caratterizzato da deformità cranio-facciali, nessuna crescita di incidenza tumorale e nessuno scompenso del midollo osseo sono stati registrati, indicando che

questi due tipi di conseguenze non sono necessariamente comuni a tutte le alterazioni della biogenesi del ribosoma. La tabella 1 riassume le principali caratteristiche dei disturbi ereditari in cui la biogenesi del ribosoma è alterata.

Table 1. Human Inherited Disorders Attributable to Defects of Ribosomal Biogenesis and Cancer Susceptibility

Disease	Gene(s)	Function(s)	Bone marrow failure	Cancer susceptibility
X-linked dyskeratosis congenita	<i>DKC1</i>	rRNA and snRNA pseudouridylation, telomerase stabilization	Yes	Yes: lymphomas, squamous carcinomas
Diamond-Blackfan anemia	<i>RPS19</i> (25%), <i>RPS26</i> (2%), others?	28S rRNA processing, 40S subunit maturation	Yes	Yes: leukemia, osteosarcoma
Cartilage-hair hypoplasia	<i>RMRP</i>	pre-rRNA cleavage	Yes	Non-Hodgkin's lymphoma, basal cell carcinoma
Shwachman-Diamond syndrome	<i>SBDS</i> , others	rRNA processing—ribosome maturation? Nucleolar localization	Yes	Leukemia
Treacher-Collins syndrome	<i>Tcf1</i>	rRNA transcription and maturation	No	No

Alterations of ribosome biogenesis and cancer susceptibility in inherited disorders.

In aggiunta a queste importanti osservazioni relative a casi umani, alcuni dati prodotti da esperimenti in vivo su modelli animali supportano ulteriormente l'ipotesi che alterazioni nella biogenesi del ribosoma possono favorire trasformazioni neoplastiche. Nella drosofila le mutazioni, inducendo l'espressione del gene codificante per la proteina ribosomale S6, possono provocare una crescita aberrante delle cellule e trasformazioni neoplastiche del sistema ematopoietico. Nel pesce zebra molti geni ribosomali proteici si comportano come soppressori tumorali. Infatti le mutazioni eterozigote in 11 differenti geni ribosomali proteici portano ad un elevata incidenza di cancro.

La maggior parte degli esempi riportati sono perfettamente in linea con l'ipotesi di un meccanismo di trasformazione neoplastica supportato da eventuali difetti nella biogenesi del ribosoma. Come ipotizzato, ciò potrebbe essere dovuto a difetti intrinseci del ribosoma che portano all'alterazione nella traduzione di specifici mRNA, molto importanti nella tumorigenesi. Ad ogni modo esiste anche una spiegazione alternativa possibile. Per prima cosa le alterazioni nella biogenesi del ribosoma possono produrre dei cambiamenti quantitativi nella disponibilità cellulare del ribosoma che può influenzare la traduzione di geni coinvolti nella trasformazione neoplastica. In secondo luogo la maggior parte delle proteine coinvolte, comprese le proteine ribosomali, hanno delle funzioni ribosomali extra. Tali funzioni possono supportare la tumorigenesi indipendentemente dalla funzione del ribosoma e dalla traduzione di mRNA. In fine, il crollo di un processo ben coordinato come la biogenesi del ribosoma, può generare dei prodotti (es. proteine ribosomali non assemblate) che possono colpire altre funzioni cellulari rilevanti nella tumorigenesi. (es. checkpoints).

CAPITOLO 3

3.1 Dimensioni e funzioni nucleolari nelle cellule tumorali.

Il nucleolo è una unità strutturale-funzionale ben definita del nucleo delle cellule in cui si trovano i geni ribosomali e dove si verifica la sintesi del RNA ribosomale. La morfologia del nucleolo è molto variabile a seconda dell'attività delle cellule. Dalla fine del secolo scorso, patologi si sono resi conto che l'ipertrofia del nucleolo è una delle caratteristiche citologiche più consistenti presenti nelle cellule tumorali. I cambiamenti morfologici nucleolari sono stati quindi utilizzati per cercare di distinguere le cellule maligne dalle corrispondenti benigne cercando dunque un approccio mirato alla patologia tumorale. Tuttavia, l'importanza della morfologia nucleolare per scopi diagnostici relativi alla patologia tumorale è stata ridotta, per due ragioni. I nucleoli infatti nelle cellule tumorali sono molto variabili in forma e dimensioni, inoltre l'ipertrofia nucleolare e la forma irregolare sono spesso osservate non solo nelle cellule tumorali, ma anche nelle cellule proliferanti normali. D'altra parte, un grave svantaggio per l'utilizzo del nucleolo come ausilio diagnostico nella patologia tumorale è che il significato biologico dei cambiamenti nucleolari nelle cellule tumorali deve ancora essere chiarito. Sono state ottenute nuove interpretazioni sul significato dei cambiamenti nucleolari circa la patologia tumorale attraverso studi sui cambiamenti distributivi di un gruppo di proteine nucleolari, le proteine AgNOR, nei tessuti maligni. Queste proteine sono necessarie per la biogenesi ribosomale e sono selettivamente colorate attraverso l'argento. Questa tecnica si basa sulla natura argilofila di diverse proteine nucleolari, le quali si associano alle repliche dei geni ribosomali DNA (rDNA),

che codificano la sequenza per gli rRNA. Le repliche del rDNA comprendono le regioni organizzatrici del nucleolo (NORs), e la risultante struttura colorata d'argento è denominata AgNORs. L' AgNORs può essere quantificata attraverso il conteggio o da un metodo morfometrico che effettua un'analisi delle immagini riportate su un computer per misurare l'area AgNOR in ciascuna cellula. Le due principali proteine AgNOR sono la nucleolina e la proteina B23, che sono coinvolte nella sintesi e nell'elaborazione di rRNA. Studi condotti su campioni citoistologici in situ e su proteine isolate hanno mostrato che la quantità delle proteine AgNOR aumenta progressivamente quando cellule quiescenti entrano nel ciclo mitotico da G1- fino al termine della fase-S (figura 6)

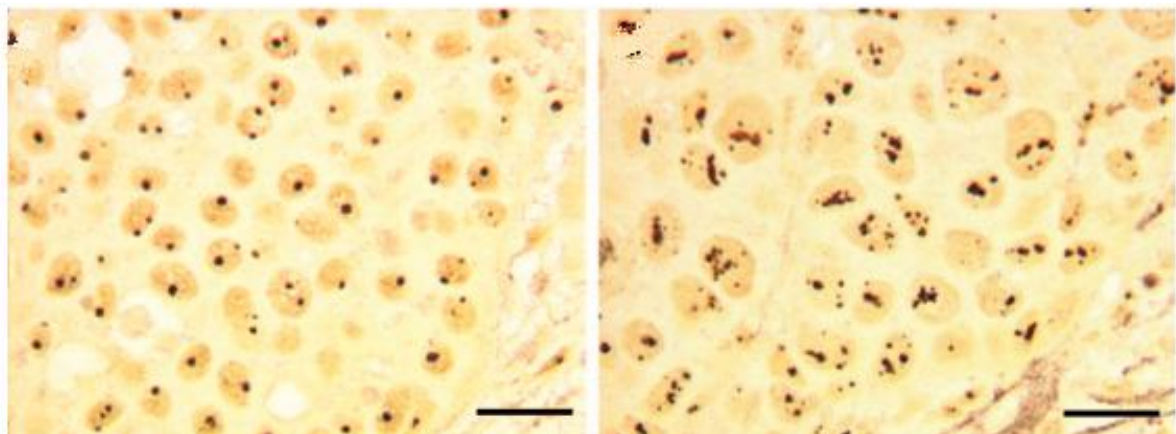


Figura 6

Inoltre, essendo la grandezza AgNOR inversamente proporzionale al tempo di duplicazione delle cellule e al tempo di duplicazione delle masse tumorali, è unica tra i marcatori di proliferazione e può essere usata per misurare il tasso di proliferazione del tumore, non solo la proporzione delle cellule tumorali che stanno proliferando. La quantità di proteine AgNOR rappresenta un importante indicatore prognostico per le neoplasie. La colorazione AgNOR può anche rintracciare i geni tumorali nascosti e lo stato di soppressione tumorale delle cellule. Ad esempio, il soppressore tumorale pRb e

p53 possono entrambi inibire la trascrizione del rRNA, e i tumori al seno nell'essere umano che mutano o cancellano pRb o p53 hanno dei nucleoli significativamente più ampi, e anche un livello AgNOR più elevato, rispetto ai tumori con uno stato di pRb o di p53 normale. Al fine di ottenere maggiori informazioni sulla relazione tra l'attività nucleolare, dimensione e il tasso di proliferazione delle cellule tumorali, nello studio preso in esame si è valutato: 1) l'attività trascrizionale del rRNA; 2) la distribuzione quantitativa di UBF, DNA topoisomerasi I, e fibrillarina, tre proteine nucleolari coinvolte nel controllo della sintesi e nell'elaborazione di rRNA; e 3) la dimensione nucleolare in situ in seguito alla loro colorazione blu mediante toluidina in sette linee cellulari tumorali umane caratterizzate da diversi tempi di duplicazione. I risultati ottenuti indicano una chiara relazione tra il tasso di proliferazione cellulare, la funzione e dimensione nucleolare.

3.2 Risultati sperimentali

Colture cellulari

Lo studio ha utilizzato sette linee cellulari stabilizzate derivate da tumori umani di diversa origine: CHP 212, SJNKP, IMR 32, e le linee di cellule SY5Y sono derivate da neuroblastomi; LoVo e SW 620 linee cellulari derivate da adenocarcinoma del colon; e la linea cellulare TG derivata da un carcinoma delle tube. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in crescita asincrona come colture monostrato in terreno RPMI 1640 (CHP212, SJNKP, IMR 32, SY5Y, e TG), mezzo L-15 (SW620), e mezzo F10 di Ham (LoVo) integrato con aminoacidi non essenziali, 100 U/ml di penicillina, 100 µl/ml streptomycin, e siero fetale bovino al 10%. Per la valutazione della crescita cellulare, inoculi di cellule 5×10^5 sono state seminate in piastre di plastica Petri. Il tempo di

uplicazione di una popolazione cellulare (DTS) viene determinato contando le cellule in campioni triplicati a 24 -, 48 -, e a intervalli di 72 ore secondo il metodo descritto da Patterson.

Tempo di duplicazione della cellula

Il tempo di duplicazione della cellula per ciascuna delle sette linee cellulari umane è stata misurato contando in triplicato la crescita delle cellule a intervalli di 24 ore. Il tempo medio di duplicazione di ciascuna linea cellulare è riportato nella Tabella.

Attività della RNA polimerasi I

L'attività della RNA polimerasi è stata valutata in vitro secondo Stirpe e Novello sullo stesso numero di nuclei purificati da sette diverse linee cellulari tumorali misurando l'incorporazione già avviata di [³H] UTP e allungando le trascrizioni ribosomali. Tre valutazioni per ciascuna linea cellulare sono state eseguite, e i valori medi sono riportati in Tabella. I valori più elevati dell' incorporazione [³H] UTP nel RNA ribosomale erano presenti nelle linee cellulari TG, SJNKP, e CHP 212. Nei nuclei delle cellule SW 620, l'attività della RNA polimerasi ha mostrato valori intermedi. I nuclei delle cellule purificate da LoVo, SY5Y, e IMR 32 mostravano un'attività enzimatica significativamente inferiore.

La valutazione quantitativa del totale delle proteine nucleari nei gel colorati SDS con Coomassie blu

L'analisi densitometrica dei gel SDS ha separato le proteine nucleari da sette linee cellulari, e dopo la colorazione con Coomassie blu è emerso che la quantità di proteine totali delle tre linee cellulari a più rapida proliferazione era altamente variabile (valori IOD: 758,26 per CHP 212; 561,83 per TG; 376,96 per SJNKP) e non correlata con il

DT (tempo di duplicazione). I valori IOD della quantità di proteine totali delle cellule intermedie e lentamente proliferanti erano inferiori a quelli delle tre linee cellulari più veloci e non sono collegati al DT della cellula, pur mostrando figure molto simili (valori IOD: 191,03 per SW 620; 208,49 per LoVo; 170,69 per SY5Y e 159,68 per IMR 32).

Valutazione quantitativa dei UBF, DNA topoisomerasi 1, e fibrillarina in Western Blot

È valutato la distribuzione quantitativa di UBF, della DNA topoisomerasi 1 e della fibrillarina nello stesso numero di nuclei per ciascuna delle linee sette cellulari di cancro utilizzando proteine nucleari sondate con anticorpi specifici separate con gel di poliacrilammide SDS del Western blot. Dopo il trattamento con un secondo tipo di anticorpi legati alla perossidasi, sono stati rivelati immunocomplessi mediante la chemiluminescenza. La valutazione quantitativa delle tre proteine è stata effettuata da un'analisi computerizzata densitometrica dei segnali autoradiografici. L'anticorpo anti-UBF ha dato luogo a due segnali positivi a 94 e 97 kd corrispondenti a doppietti di UBF umani purificati (UBF1 e UBF2; figura 7).

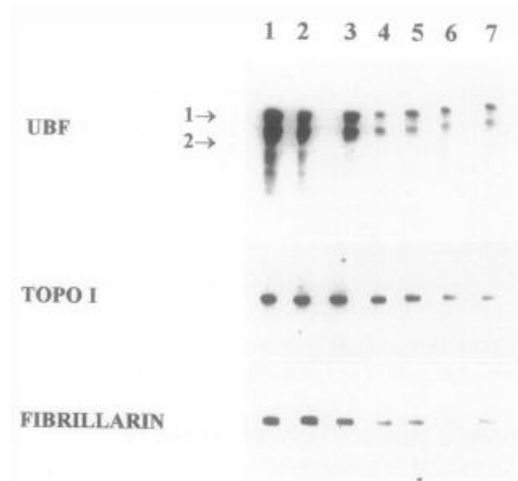


Figura 7

L'anticorpo anti-DNA topoisomerasi umano ha dato origine ad un segnale positivo a 100 kd e l'anticorpo antifibrillarina umano a 34 kd. I valori di densità ottica integrati di UBF, della DNA topoisomerasi I e delle bande di fibrillarina sono riportati in Tabella 1. Risultano essere inversamente proporzionali al tempo di duplicazione cellulare ($r = -0.87$, $P = 0.001$; $R = -0.97$, $p < 0.001$, $r = -0.91$, $p = 0.005$, rispettivamente) e direttamente proporzionali all'attività della RNA polimerasi ($r = 0.89$, $P = 0.008$; $r = 0.95$, $P = 0.001$; $r = 0.91$, $P = 0.004$, rispettivamente). La distribuzione quantitativa di ogni proteina è legata a quella delle altre due proteine (UBF contro topoisomerasi I: $r = 0.89$, $p = 0.007$; UBF contro fibrillarina: $r = 0.94$, $p = 0.002$; topoisomerasi contro fibrillarina: $r = 0.91$, $P = 0.005$).

Area nucleolare

Per valutare l'area nucleolare, le sette linee di cellule tumorali sono state colorate con toluidina blu. È un colorante basico che si lega sia RNA e DNA. Nei campioni methacarn fissi, la toluidina blu visualizza preferenzialmente strutture contenenti RNA e quindi nucleoli in cui l'RNA è molto concentrato. Nelle preparazioni, il trattamento con soluzione ipotonica ha aumentato la selettività di colorazione nucleolare. I nucleoli erano di colore blu e chiaramente distinguibili in ogni nucleo debolmente colorato. I margini dei nucleoli colorati dalla toluidina blu erano chiaramente definiti (figura 8).

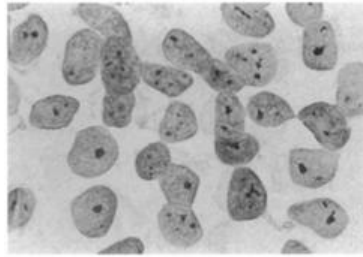
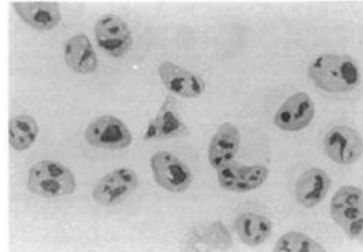


Fig. 8



La distribuzione di tutte le strutture nucleolari per cellula è stata valutata in 200 cellule per ciascuna linea cellulare. I valori medi sono riportati nella Tabella 1. La distribuzione delle proteine AgNOR nei nucleoli è stato misurato anche nelle sette linee cellulari tumorali selettivamente colorate con argento utilizzando l'analisi automatizzata dell'immagine. I valori medi di area delle proteine AgNOR su 200 nuclei per ciascuna linea cellulare sono riportata nella Tabella. Nelle sette linee cellulari di cancro, il valore di toluidina blu nell'area delle strutture nucleolari era inversamente proporzionale al tempo di duplicazione cellulare ($r = -0.98$, $p < 0.001$), e direttamente collegata sia all'attività RNA polimerasi ($r = 0.94$, $P = 0.001$) sia all'espressione di UBF, della topoisomerasi I del DNA e della fibrillarina ($r = 0.92$, $P = 0.003$; $r = 0.98$, $p < 0.001$; $r = 0.95$, $P = 0.001$, rispettivamente). È stata inoltre osservata una chiara relazione tra la zona nucleolare colorata di blu dalla toluidina e quella colorata d'argento ($r = 0.98$, $p < 0.001$).

Table 1.

Cell line	Origin	DT (hours)	RNA polymerase I (dpm/ 10^6 nuclei)	Western blots with antibodies*			Nucleolar area (μm^2)	
				UBF	Topoisomerase I	Fibrillar	Toluidine blue	AgNOR
CHP 212	Neuroblastoma	21	630 \pm 62	1153	1118	699	25.2 \pm 6.33	19.2 \pm 5.06
TG	Tubal carcinoma	20	780 \pm 43	1078	1127	739	24.5 \pm 6.72	17.9 \pm 4.32
SJNKP	Neuroblastoma	22	779 \pm 123	1013	1096	587	21.2 \pm 5.85	18.1 \pm 4.50
SW 620	Colon carcinoma	42	331 \pm 99	644	847	342	15.5 \pm 4.67	11.5 \pm 2.96
LoVo	Colon carcinoma	64	234 \pm 12	727	816	373	12.8 \pm 4.16	7.7 \pm 2.41
SYSY	Neuroblastoma	77	127 \pm 18	643	617	110	7.2 \pm 3.91	4.9 \pm 1.77
IMR 32	Neuroblastoma	82	122 \pm 7	648	490	280	5.9 \pm 2.12	4.5 \pm 1.64

*Values relative to immunoreactive bands were obtained by densitometric analysis of autoradiograms and are reported in arbitrary units.

3.3 Discussione

I presenti risultati hanno dimostrato che esiste una relazione chiara tra il tasso di proliferazione cellulare e l'attività funzionale nucleolare. In sette linee cellulari tumorali umane, l'attività della polimerasi RNA risulta essere inversamente proporzionale al tempo di duplicazione cellulare ($r = -0.97$, $p < 0.001$). Più alto è il valore della sintesi del rRNA, più veloce è la duplicazione cellulare. L'attività di trascrizione del RNA ribosomale è stata valutata misurando la quantità di $[H]^3$ -UTP (incorporato in $r = 0.91$, $p = 0.004$ per fibrillarina). Infine, i valori delle tre proteine erano collegati tra loro in sette linee cellulari tumorali (UBF contro topoisomerasi I: $r = 0.89$, $p = 0.007$; UBF contro fibrillarina: $r = 0.94$, $p = 0.002$; topoisomerasi contro fibrillarina: $r = 0.91$, $P = 0.005$). Ci sono prove che le proteine nucleolari UBF, la DNA topoisomerasi I, e la fibrillarina hanno funzioni importanti nella sintesi e nell'elaborazione rRNA. UBF attiva la trascrizione di geni dell'RNA ribosomale legandosi ad elementi promotori. L'attività di UBF può essere modulata dalla sua fosforilazione. D'altra parte, è evidente che l'attività di UBF è anche regolata dalle variazioni del suo valore all'interno della cellula. Questi dati sono coerenti con i risultati ottenuti mostrando una relazione tra la quantità di UBF e l'attività della RNA polimerasi I nelle linee cellulari tumorali. La fibrillarina è localizzata nel componente fibrillare denso dell'interfase dei nucleoli come un complesso ribonucleoproteico contenente U3 snRNA, ed è risultata essere sovra-espressa nelle cellule proliferanti. La DNA topoisomerasi è concentrata nei nucleoli ed è coinvolta nel controllo della trascrizione del rDNA. Il suo accumulo nei nucleoli è legato alla sintesi dell'RNA in corso. La topoisomerasi interagisce con la nucleolina, e le

variazioni quantitative sono legate al grado di sintesi del rRNA nelle cellule proliferanti. In uno studio precedente effettuato sulle stesse sette linee cellulari del cancro utilizzate nella presente inchiesta, è stato dimostrato che la quantità di nucleolina e di proteine B23, due proteine nucleolari coinvolte nella sintesi del rRNA, l'elaborazione e il trasporto, sono inversamente proporzionali ai tempi di duplicazione della cellula. I dati di questi studi, nel loro insieme, indicano che il livello di sintesi del rRNA nelle cellule proliferanti è continuamente legato alla distribuzione quantitativa di tutte le principali proteine nucleolari coinvolte nel controllo della biogenesi dei ribosomi. Queste osservazioni suggeriscono le seguenti considerazioni. Il livello di espressione della proteina nucleolare è strettamente coordinato in ciascuna linea cellulare ed è molto probabile che il livello di espressione della proteina sia in grado di controllare la sintesi di rRNA. Come la biogenesi ribosomale è una condizione limite della duplicazione cellulare, il controllo della velocità di proliferazione cellulare può essere effettuato dalla modulazione dell'espressione delle proteine nucleolari coinvolte nella trascrizione genica rDNA, nella trasformazione di rRNA, e nel trasporto dei trascritti nel citoplasma. Questi risultati hanno chiaramente dimostrato che esiste una stretta relazione tra il tasso di proliferazione cellulare e la dimensione dei nucleoli nelle stesse linee cellulari tumorali. L'area delle strutture nucleolari per cellula colorati di toluidina blu e valutati per immagine citometria era inversamente proporzionale al tempo di duplicazione ($r = 0.98$, $p < 0.001$). D'altra parte, la quantità delle strutture nucleolari per cellula era direttamente legato ai parametri relativi alle funzioni nucleolari ($r = 0.94$, $p = 0.001$ per l'attività RNA polimerasi; $r = 0.92$, $p = 0.003$ per UBF; $r = 0.98$, $p < 0.001$ per DNA topoisomerasi I; $r = 0.95$, $P = 0.001$ per la fibrillarina). Questi dati indicano che:

- 1) nelle cellule proliferanti cambiamenti continui dell'attività trascrizionale del rRNA sono strettamente collegati alla distribuzione quantitativa delle strutture nucleolari

all'interno delle cellule e 2) l'intera area nucleolare per ciascuna cellula è un parametro morfologico della rapidità di proliferazione cellulare. Il rapporto tra la dimensione nucleolare e tempo di replicazione delle cellule proliferanti può essere spiegato dal fatto che la dimensione dei nucleoli è strettamente correlata alla loro attività sintetica di rRNA. Nelle cellule proliferanti, la sintesi di rRNA aumenta progressivamente dalla prima fase G1 fino alla fase S del ciclo cellulare insieme alla dimensione del nucleolo. Il progressivo aumento della sintesi di rRNA e delle dimensioni nucleolari avviene a causa di un aumento della domanda di biogenesi ribosomiale che, a sua volta, è dovuto al fatto che una cellula che deve duplicare il suo contenuto proteico prima della divisione. Il tempo necessario alla sintesi proteica per la divisione cellulare può essere più o meno lungo a seconda della lunghezza del ciclo cellulare e della biogenesi ribosomiale, fortemente richiesta dalle cellule che impiegano un arco di tempo molto breve per riprodursi e che hanno dunque una maggiore necessità di sintesi proteica, a differenza delle cellule lente nel proliferare. Qual è l'importanza del nucleolo nella patologia tumorale? I risultati indicano che la dimensione dei nucleoli non può essere usata per scopi diagnostici, per distinguere le lesioni maligne da quelle benigne. Infatti, il tempo di duplicazione delle lesioni cancerose è molto variabile, e di conseguenza molti tumori, avendo un tempo molto lungo di duplicazione, mostrano nucleoli molto piccoli che non possono essere visualizzati in campioni di tessuto regolarmente trasformati. Solo i nucleoli estremamente ingranditi possono essere considerati una caratteristica delle cellule tumorali. D'altra parte, la dimensione nucleolare può essere di grande importanza ai fini prognostici, rappresentando l'unico parametro morfologico che indica la rapidità di proliferazione cellulare. Inoltre, i risultati hanno dimostrato una stretta relazione tra la quantità di proteine nucleolari UBF, DNA topoisomerasi 1, e fibrillarina, e le dimensioni delle strutture nucleolari (rispettivamente $r = 0,92$, $p =$

0,003; $r = 0,98$, $P < 0,001$; $r = 0,95$, $p = 0,001$) suggerendo che uno specifico rilevamento immunocitochimico di queste proteine potrebbe essere utilizzato anche per una quantificazione precisa delle strutture nucleolari nelle patologie tumorali.

3.4 Proteine nucleolari: biomarcatori.

L'avvento di tecniche avanzate nella microscopia, tra cui il microscopio a fluorescenza, il live cell imaging (lo studio delle cellule viventi usando la microscopia) e degli studi proteomici su larga scala utilizzando la spettrometria della massa, hanno reso possibili analisi molto più ampie e approfondite sui processi nucleolari, sulla struttura e sulla composizione biochimica. Dal quel momento in poi è stato evidente che il ruolo del nucleolo nelle cellule si estende ben oltre alla biogenesi dei ribosomi. Ad esempio, delle 700 proteine umane identificate nel nucleolo, solo il 30% circa viene utilizzata per la biogenesi dei ribosomi. Altre proteine nucleolari hanno funzioni che includono la regolazione del ciclo delle cellule, la riparazione del DNA, la senescenza delle cellule, la risposta delle cellule allo stress. In relazione a quanto appena affermato, probabilmente non sorprenderà il fatto che i cambiamenti del livello e/o delle localizzazioni subcellulari di numerose proteine nucleolari permettono che esse vengano identificate come biomarcatori. Per prima cosa, tra i biomarcatori del cancro associati al nucleolo, bisogna menzionare: la telomerasi e Ki-67. L'enzima telomerasi è una proteina ad RNA che estende i telomeri, i segmenti terminali dei cromosomi, i

quali altrimenti diventerebbero progressivamente più corti in ogni replica del DNA. Nella maggior parte dei tumori umani, la telomerasi è sovraespressa, di conseguenza ciò permette alle cellule di riprodursi all'infinito. Il marcatore di proliferazione Ki-67 è invece ampiamente usato nella patologia, e questa proteina nucleolare agisce nella trascrizione del rRNA.

Altri importanti biomarcatori nucleolari sono quelli implicati nella regolazione del soppressore tumorale p53; p53, che troviamo modificato in più del 50% dei tumori analizzati. Esso funge da “gatekeeper” il quale regola il processo di controllo delle cellule, l'apoptosi, e la senescenza delle cellule. In condizioni di normalità, la proteina p53 si mantiene ad un livello molto basso e viene stabilizzata solo in base allo stress cellulare, ai danni al DNA, o ad un'anomala espressione dell'oncogene. Le proteine nucleolari rappresentano uno dei meccanismi chiave nella regolazione di p53. Il soppressore tumorale nucleolare ARF può essere un ottimo esempio. Normalmente ARF si trova per lo più nei nucleoli; ad ogni modo, quando la struttura nucleolare è distrutta, ARF si localizza nel nucleoplasma, dove contribuisce ad evitare la degradazione di p53. Altre proteine nucleolari che possono regolare p53 sono la nucleostemina, la nucleofosmina e la nucleolina. Tutte queste proteine sono state identificate come biomarcatori. La sovraespressione, la non espressione, e/o i cambiamenti nella localizzazione di queste proteine sono stati correlati sia con le neoplasie sia con malattie più aggressive. E' comunque importante notare che le funzioni di queste proteine non si limitano alla regolazione di p53, infatti includono la biogenesi dei ribosomi e il mantenimento del genoma, indicando che l'espressione alterata o la localizzazione di queste proteine ha la capacità di provocare diversi effetti.

Inoltre il gene della nucleofosmina, NPM1, si fonde con la chinasi del linfoma anaplastico (ALK), gene che viene spesso trovato nelle grandi cellule anaplastiche del linfoma, con il Fattore 1 della leucemia mieloide (MLF1), gene della sindrome mielodisplastica, e con il recettore acido retinoico alfa (RARA), gene che troviamo nelle forme acute di leucemia promielocitica (APL). Inoltre, circa il 35% dei pazienti adulti affetti da leucemia mieloide acuta subiscono mutazioni al NPM, le quali fanno sì che esso venga rilocalizzato nel citoplasma. Di conseguenza NPM, sia in condizioni di normalità sia in uno stato alterato, viene utilizzato per la diagnosi, la prognosi dei carcinomi e per il monitoraggio dei residui minimi della malattia.

Uno dei temi principali che può essere trattato in relazione ai biomarcatori nucleolari descritti in precedenza, riguarda il fatto che i mutamenti nella composizione biochimica del nucleolo, attraverso i cambiamenti sia nel livello di espressione delle proteine sia nella loro localizzazione, spesso si verificano durante la carcinogenesi e ciò può comportare delle alterazioni nell'intera topografia del nucleolo. Forse uno dei migliori esempi a riguardo ci viene fornito dal compartimento perinucleolare, il quale è localizzato nella periferia nucleolare. Esso non si trova nelle cellule normali, e la sua presenza è stata identificata come un marcatore cancerogeno con valore prognostico per i tumori di una certa consistenza.

CAPITOLO 4

4.1 Terapia del cancro

Il nucleolo gioca un ruolo centrale nella sintesi regolata positivamente del rRNA a sostegno della biogenesi ribosomale, segno distintivo della crescita cellulare aberrante. Questa funzione, assieme alle caratteristiche patoistologiche uniche nelle cellule maligne e alla sua capacità di mediare l'apoptosi, rende questa struttura sub-nucleare un potenziale bersaglio per agenti chemioterapici. Esistono alcune piccole molecole strutturalmente e funzionalmente diverse che pare abbiano la capacità sia di interagire direttamente con il nucleolo, sia di alterare indirettamente la sua funzione agendo sui suoi componenti dinamici. Queste molecole comprendono tutte le principali classi di agenti intercalanti nel DNA, antimetaboliti, inibitori della chinasi, farmaci anti-infiammatori, antibiotici naturali, oligopeptidi, così come le nanoparticelle. Insieme, queste molecole forniscono inestimabili elementi di ricerca circa la struttura e la funzione del nucleolo. Essi forniscono inoltre un'opportunità unica per sviluppare nuove strategie di intervento chemioterapico più selettivo e quindi meglio tollerato. A questo proposito, l'inibizione della sintesi del rRNA mediata dalla RNA polimerasi I sembra essere un meccanismo promettente per uccidere le cellule tumorali. Il recente sviluppo di molecole, mirate alle strutture G-quadruplex formando sequenze di geni rRNA, sono attualmente in fase di sperimentazione clinica e sembrano attestare il successo di questo approccio.

4.2 Antibiotici

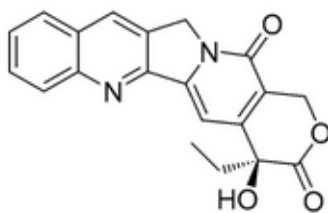
1. Actinomicina D

L'actinomicina D, un antibiotico polipeptide, lega il DNA duplex e diminuisce la sintesi dell'RNA bloccando Pol I. Questa inibizione è considerata un processo reversibile a causa della dissociazione dell'actinomicina D (un agente intercalante reversibile) dal DNA duplex, che riavvia la trascrizione normale. Actinomicina D è unica nel suo genere in quanto inibisce rRNA e la sintesi di RNA citoplasmatico, ma non inibisce la sintesi di RNA o DNA cromosomico a basse concentrazioni. Ciò suggerisce che l'antibiotico agisce selettivamente sul modello rDNA nel nucleolo inibendo la trascrizione del rRNA, rallentando la biogenesi ribosomale e abbassando i livelli citoplasmatici di RNA. Ciò evidenzia un meccanismo del nucleolo-mediato, il quale viene supportato da studi che dimostrano che una ridistribuzione dei componenti nucleolari si verifica durante il trattamento dell' actinomicina.



2. La camptotecina ed analoghi

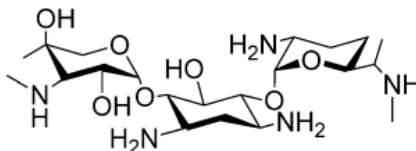
La camptotecina e suoi derivati clinicamente attivi come irinotecano (pro-farmaco) e topotecano (analogo solubile in acqua) sono alcaloidi chinolonici utilizzati come agenti chemioterapici. I farmaci sono potenti inibitori della topoisomerasi I (Topo I), un enzima capace di controllare la deformazione del DNA che si verifica durante la trascrizione e la replicazione. La topoisomerasi I risiede prevalentemente nei nucleoli delle cellule, aiutando l'rRNA nell'allungamento della trascrizione. Nelle cellule trattate con questa classe di farmaci, Topo I viene ridistribuito nel nucleoplasma, e la formazione di un complesso scindibile covalente Topo I-DNA, che è stabilizzato dalla camptotecina e dai suoi analoghi, in ultima analisi, porta alla morte cellulare.



3. Gentamicina

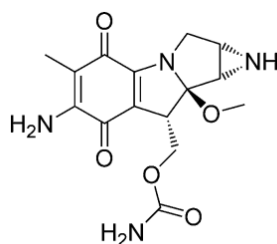
La gentamicina è un antibiotico aminoglicoside usato per trattare la tubercolosi e le infezioni batteriche Gram-negativi, il quale è stato coniugato al fluoroforo Texas Red per formare un composto farmaco-fluoroforo, GTTR. Due linee cellulari renali, OK e MDCK, sono state incubate assieme a GTTR per due ore e osservate al microscopio a fluorescenza per determinare la localizzazione cellulare del farmaco. Insieme all'accumulo endosomiale, l'accumulo intranucleare si è verificato nei nucleoli e nei tubuli transnucleari. La localizzazione nei nucleoli può essere spiegata da studi

precedenti i quali illustrano la propensione della gentamicina a legare i ribosomi e rRNA.



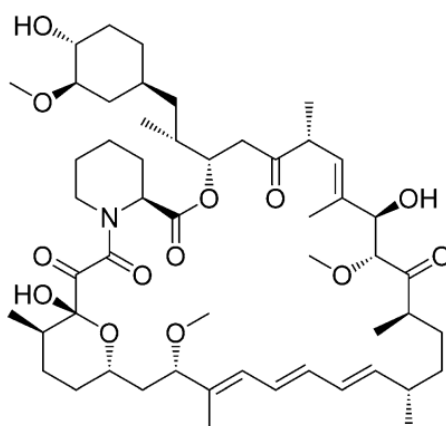
4. Mitomicina C

La mitomicina C è un antibiotico potente, originariamente isolato dai batteri Gram-negativi *Streptomyces caespitosus*. È usato come agente chemioterapico solitamente in vescica, colon, e tumori al seno. Si tratta di una molecola bio-riduttiva, che, dopo la sua attivazione enzimatica nel citosol, induce site-specific DNA cross-link. La mitomicina C in precedenza veniva considerato un agente alchilante danneggiante l'eterocromatina, è stato inoltre recentemente dimostrato che esso causa irreparabili legami incrociati con rDNA e porta alla inibizione della sintesi di rRNA. Nelle cellule del carcinoma mammario MCF-7, il trattamento con la mitomicina C ha portato ad una diminuzione del 25% dei livelli di 18S rRNA, molto probabilmente a causa del legame con il farmaco con degradazione del rDNA trascritto. Dati di microscopia elettronica suggeriscono che la mitomicina C provoca una separazione e una ridistribuzione dei componenti nucleolari in seguito al trattamento con il farmaco, il che conferma ulteriormente la presenza di un meccanismo d'azione mediata dal nucleolo.



5. Rapamicina ed analoghi

I derivati della rapamicina ("rapalogues"), inclusi temsirolimus, everolimus, e deformolimus, sono macrolidi che sono tipicamente utilizzati come immunosoppressori o agenti chemioterapici in clinica. Essi sono potenti inibitori del percorso di segnalazione PI3K-AKT-mTOR, che è mutato in una percentuale elevata di tumori. In particolare, questa classe di farmaci inibisce il complesso mTORC1 che svolge un ruolo nella trascrizione del rRNA e nella biogenesi ribosomale. I "rapalogues" disattivano un componente importante del processo di RNA polimerasi I, TIF-1A, mediante un cambiamento di fosforilazione. Questi farmaci possono anche inibire la trasformazione del rRNA, osservata da un accumulo di rRNA intermedi.

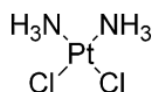


4.3 Agenti intercalanti nel DNA

1. Cisplatino

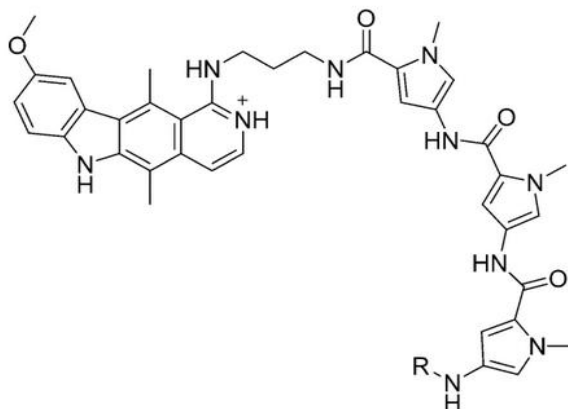
Il cisplatino, cis-diamminedichloridoplatinum (II), è un agente chemioterapico del platino ampiamente utilizzato in clinica. Esso costituisce *il cross-link 1,2-intrastrand* e si lega covalentemente con il platino alla posizione N7 di basi puriniche del doppio filamento di DNA. Il cisplatino ha la capacità di inibire indirettamente la sintesi di rRNA in coltura cellulare causando una redistribuzione dei processi di trascrizione del

rRNA nel nucleolo. Questi includono il fattore di legame (UBF), la proteina legante TATA (TBP), i fattori TBP-associati per Pol I (TAFIs), e la Pol I stessa. Insieme alla ridistribuzione delle proteine nucleolari, ha luogo un blocco di RNA nucleolare (micronucleoli), e l'attivazione di una cascata di caspasi, che in ultima analisi porta all'apoptosi.



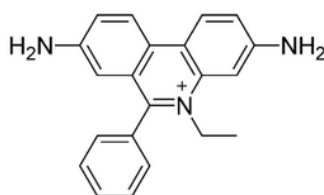
2. Agente ibrido distamicina-ellipticina ("Distel")

Composti cationici sono stati sintetizzati contenenti la distamicina, il classico legante il solco minore del DNA e l'intercalatore ellipticina, con l'obiettivo di generare molecole in grado di riconoscere specifiche sequenze del DNA. Esperimenti biofisici e biochimici sono stati eseguiti per confermare l'associazione ibrida proposta dal metodo Distel, che distorce la struttura della forma-B del DNA in modo significativo. La microscopia a fluorescenza è stata utilizzata per rilevare Distel e l'ellipticina nelle cellule trattate. Sia il composto che l'intercalatore stesso si accumulano di solito nei nuclei delle cellule HeLa. A differenza della fluorescenza dell'ellipticina, che mostra un'alta intensità in tutto il nucleo, la fluorescenza Distel è meno pronunciata ed è localizzata nel nucleolo.



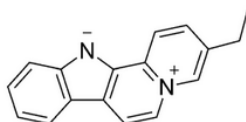
3. Bromuro di etidio

Il Bromuro di etidio (EtdBr), il classico agente intercalante del DNA, è stato oggetto di studio riguardo la localizzazione cellulare e il metabolismo in epatociti isolati di ratto. È stato determinato mediante un microscopio confocale a scansione laser (CLSM) che EtdBr viene rapidamente assorbito dai nucleoli, dalla membrana nucleare e dal reticolo endoplasmatico delle cellule in coltura. Analogamente, lo ioduro di propidio (PI), una classica colorazione rosso-fluorescente non-cellula- permeabile DNA, ha mostrato un accumulo dipendente dal tempo nelle cellule vive HeLa. L'agente non ha avuto alcun effetto significativo sulla progressione del ciclo cellulare e non sembra influenzare la risposta delle cellule ad altri agenti citotossici in esperimenti di co-trattamento.



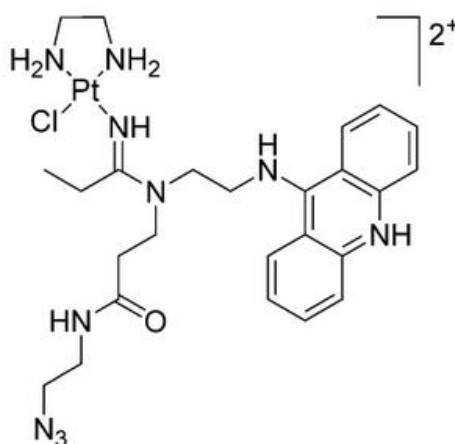
4. Flavopereirina

Flavopereirina (PB-100), è un alcaloide di origine vegetale, possiede un' eccellente attività antitumorale in diverse linee cellulari maligne pur non inibendo la crescita delle cellule normali. L'agente zwitterionico blu fluorescente si accumula rapidamente nei nucleoli delle cellule del glioblastoma U251, ma non interferisce con il controllo delle cellule astrociti normali. PB-100 pare sia solito legarsi con gli acidi nucleici ricchi di purine.



5. Agente ibrido Platino-acridina

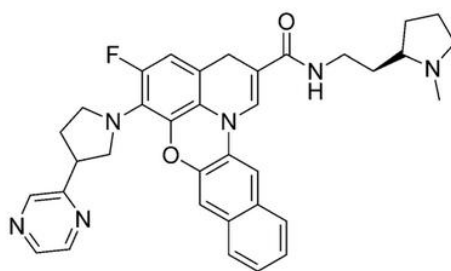
Il platino acridina derivato dal prototipo agente PT-ACRAMTU ([PtCl(en)(ACRAMTU)] (NO₃)₂; en= etan-1,2-diammina, ACRAMTU = 1-[2-(acridin-9-ylamino) etil] -1,3-dimetiltiourea) mostra un'attività antitumorale promettente in diversi tumori solidi, in particolare nel cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC). Gli agenti producono una forma/tipologia di danni al DNA unica coinvolgendo una modalità di legame covalente-intercalativo ed effetti cellulari a differenza del cisplatino. Al fine di conoscere la distribuzione subcellulare di questo farmacoforo, è stato sviluppato un analogo compatibile con l'azide-alchino cicloaddizione chimica rame-catalizzata. Il composto azide modificato è stato incubato con le cellule NCI-H460 di NSCLC e post-marcato con il fluoroforo Alexa Fluor 488-alchino. Le cellule esposte al complesso nell' interfase hanno mostrato un significativo accumulo dell'agente ibrido nel nucleo e un aumento della fluorescenza del 50% nei nucleoli rispetto all'eterocromatina.



4.4 Inibitori della RNA polimerasi I

1. CX-3543 (Quarfloxina)

La quarfloxina è un derivato delle fluorochinoline, sviluppato dopo un lungo studio della relazione tra struttura e l'attività di antibiotici fluorochinolonic, è stato dimostrato mediante microscopia a fluorescenza che esso si localizza nel nucleolo delle cellule di adenocarcinoma polmonare A549. Questo farmaco inibisce specificatamente la fase di allungamento della trascrizione della Pol I impedendo interazioni stabilizzanti tra la nucleolina (NCL) e G-quadruplex nel gene rDNA. NCL, che media la stabilizzazione di strutture G-quadruplex e previene la rigenerazione del DNA stampo nel gene rDNA ricco di G e C facilitando una rapida trascrizione della Pol I, viene selettivamente spostato dal DNA da parte di CX-3543 con una conseguente redistribuzione dal nucleolo al nucleoplasma e l'inibizione della trascrizione del rDNA. Questa attività di CX-3543 è specifica per NCL, senza aver alcun impatto sull'associazione di fattori di trascrizione Pol I, come UBF e SL-1, con il promotore rDNA, ed è stata associata alla stabilizzazione di p53 in linea con la stabilità di risposta allo stress nucleolare. In studi preclinici utilizzando un pannello di linee cellulari tumorali, CX-3543 ha mostrato un ampio effetto anti-proliferativo e una apoptosi indotta delle cellule tumorali indipendenti dal loro stato di p53. Anche se ben tollerata dai pazienti nella fase I di alcuni studi clinici, senza intossicare ulteriormente l'organo, la quarfloxina non ha proceduto alla fase II di sviluppo clinico a causa della sua biodisponibilità limitata. La quarfloxina è stata il primo agente legante G-quadruplex ad essere inserito nei test clinici umani.

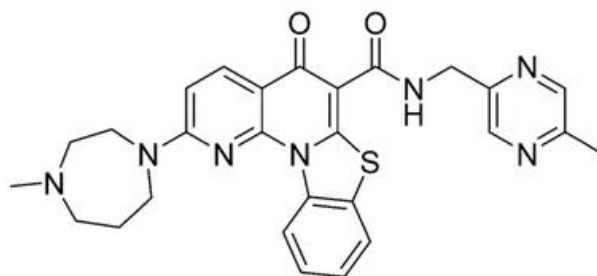


2. CX-5461

CX-5461 è un agente antitumorale orale in grado di inibire selettivamente la trascrizione da parte della RNA Pol I, il cui sviluppo è stato ispirato dalla quarfloxina legata chimicamente. Questa molecola danneggia l'inizio della trascrizione della pol1 sconvolgendo il legame tra il fattore iniziale della trascrizione SL-1 e il promotore rDNA. Il CX-5461 ha una selettività dalle 300 alle 400 volte maggiore nei confronti della pol I rispetto alla pol II e alla pol III. Gli studi in vitro hanno svelato un'elevata efficienza anti-proliferativa di CX-5461 a basse concentrazioni nanomolari in un'ampia gamma di linee cellulari cancerogene umane. Curiosamente, a dispetto del fatto che la sintesi ribosomale è costantemente sovraregolata nelle cellule cancerogene, la sensibilità verso l'inibizione della pol I varia significativamente tra le linee di cellule tumorali umane (circa 500 volte), con le neoplasie ematologiche che derivano dal p53 wild type che sono quelle più sensibili. Per analizzare se l'efficacia in vitro si traduce in un beneficio terapeutico in vivo, il trattamento con CX-5461 è stato valutato in un modello di topo geneticamente modificato affetto da un linfoma diffuso a grandi cellule B guidato da MYC (Emu-Myc linfoma), che mima molti aspetti del linfoma umano di Burkitt. La terapia continua con CX-5461 in topi affetti dal linfoma Emu-Myc ha portato alla quasi totale remissione dalla malattia con una sopravvivenza significativamente prolungata. Questo beneficio terapeutico non era una conseguenza dell'insufficienza ribosomale o della traduzione della proteina danneggiata ma è stata

associata all'attivazione immediata non genotossica di p53 e l'induzione dell'apoptosi prettamente tumorale, suggerendo che le cellule sono capaci di avvertire direttamente disturbi della trascrizione della pol I. L'induzione osservata di p53 in risposta al CX-5461 nelle cellule tumorali legate allo sconvolgimento nucleolare e all'attivazione della "via di stress nucleolare" porta al rilascio degli RP, come per esempio RPL5 e RPL11, entrambi i quali legano MDM2, eliminando così l'interazione p53-MDM2. E' significativo come la normale popolazione di cellule B è stata mantenuta, perché l'inibizione transitoria della pol I con CX-5461 non ha attivato il p53 in queste cellule. Sulla base di questo studio e di profili di tossicità favorevoli si è iniziato uno studio clinico di Fase 1 con CX-5461 in pazienti con cancro ematologico al Peter MacCallum Cancer Centre Australia, il quale offrirà conoscenze preziose riguardo l'inibizione delle sintesi ribosomale, la quale potrebbe offrire un nuovo approccio di terapia non-genotossica nella lotta contro il cancro.

Nel melanoma e nei carcinomi pancreatici, il primo passaggio che porta alla morte cellulare è l'autofagia, in contrapposizione ai modelli di leucemia e linfoma, dove il percorso principale è l'apoptosi p53-mediata. CX-5461 induce l'inibizione selettiva della sintesi del rRNA mediata dalla pol I ottenendo tossicità nelle specifiche cellule tumorali, ma non ha alcun effetto sul DNA, mRNA, o sulla sintesi proteica.



Uno dei maggiori ostacoli dell'uso di terapie che mirano alla trascrizione della pol I sarà quello di comprendere come e quando il loro uso possa essere appropriato nell'ambiente clinico. Siccome molti farmaci citotossici esistenti inibiscono indirettamente la biogenesi ribosomale, è possibile che i farmaci progettati per interferire con questo processo, come il CX-5461, potrebbero similmente essere usati come terapie non selettive per riattivare p53. In questo caso, l'uso del farmaco dipenderà dalla prova empirica raccolta da studi clinici, dove l'efficacia dell'agente viene studiata da solo o in combinazione con terapie standard. E' probabile che le terapie di trascrizione della pol I abbiano più vantaggi distinti rispetto ai chemioterapici attualmente in uso o alle radiazioni gamma che sono utilizzate in clinica per attivare p53. Per prima cosa, è probabile che le terapie di trascrizione della pol I siano significativamente meno genotossiche (che danneggiano il DNA) verso la popolazione di cellule non tumorali e associate a un minor rischio di cancro secondari, il quale è rischio notevole utilizzando agenti genotossici. A sostegno di ciò, le concentrazioni in vivo dell'inibitore della trascrizione della pol I CX-5461 che ha attivato p53 e ha indotto l'apoptosi nelle cellule maligne B non ha attivato p53, né ha indotto il danneggiamento del DNA nelle cellule B normali pur avendo inibito il suo bersaglio in modo uguale sia nelle cellule normali che in quelle tumorali. Quindi, le cellule normali sembrano avere una soglia più alta nell'attivare lo stress nucleolare e stabilizzare p53 in risposta all'inibizione della trascrizione della pol I rispetto alle cellule tumorali. Al contrario, le chemioterapie o le radiazioni gamma causano notevoli danni al DNA, e attivano p53 sia nei tumori che nelle cellule normali circostanti.

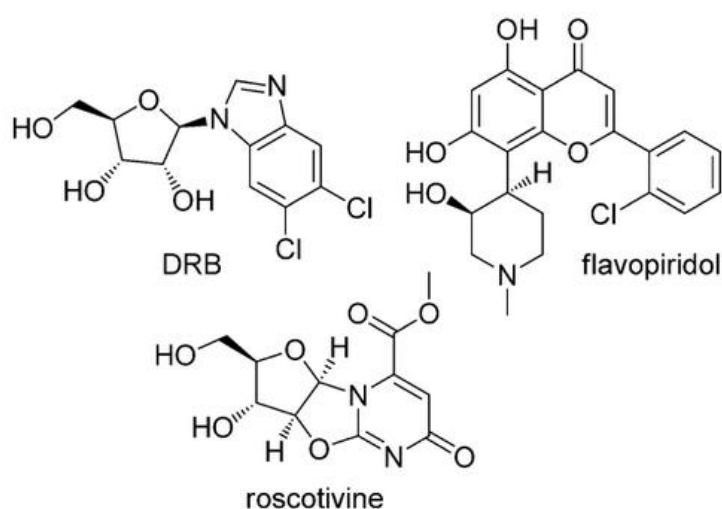
Riassumendo, la riattivazione non genotossica del p53 attraverso lo stress nucleolare sembra una nuova strada promettente per la cura di alcuni tumori. Significativamente, gli studi preliminari nei modelli di topo transgenici suggeriscono che gli inibitori della

trascrizione della Pol I hanno una notevole efficacia terapeutica contro i tumori ematologici, che sono tipicamente resistenti alle terapie standard come, per esempio, la leucemia di ceppo misto.

4.5 Altre classi di molecole

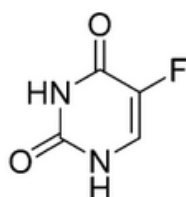
1. Inibitori cdk9

Gli inibitori chinasi ciclina-dipendenti 9 (CDK9) come DRB, il flavopiridolo, e la roscovitina inibiscono la precoce elaborazione e trascrizione di rRNA. L'inibizione della trascrizione avviene inibendo la fase di allungamento della trascrizione catalizzata da Pol I. Il blocco della trascrizione e l'elaborazione precoce di rRNA conduce alla disintegrazione e la delocalizzazione delle proteine nucleolari come nucleofosmina.



2. 5-Fluorouracile

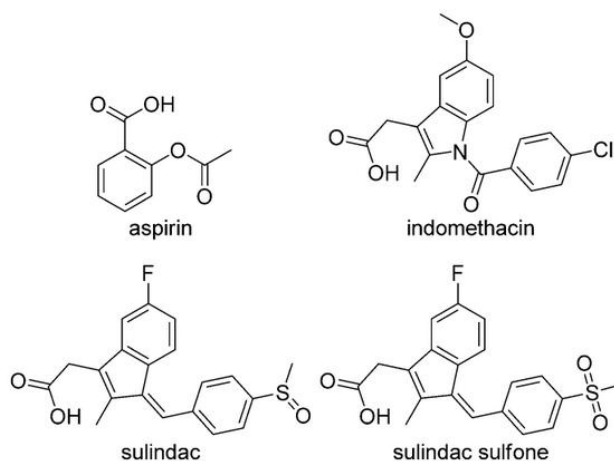
Il farmaco antitumorale 5-fluorouracile, un analogo pirimidinico, è metabolizzato attivamente nella cellula a monofosfato fluorodeossiuridina (FdUMP), trifosfato fluorodeossiuridina (FdUTP) e trifosfato fluorouridina (FUTP). I metaboliti deossi provocano danni al DNA principalmente attraverso l'inibizione della timidilato sintetasi da parte di FdUMP. Inoltre, gravi danni a RNA si verificano a causa di un'incorporazione di FUTP in varie forme di RNA, che porta alla interruzione della loro elaborazione e delle funzioni vitali. In particolare l'elaborazione finale del rRNA nel nucleolo è inibita, portando ad uno stress nucleolare, ad un'alterazione della struttura nucleolare, e all'attivazione dell'apoptosi p53-mediata.



3. Farmaci anti-infiammatori non steroidei

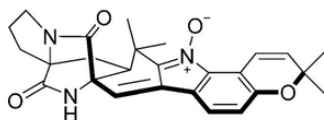
L'efficacia dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) come agenti antitumorali nei tumori del colon-retto, negli ultimi anni ha suscitato numerosi studi tesi ad approfondire la conoscenza del loro meccanismo cellulare. Nel caso dell'aspirina, sulindac, sulindac solfone, e indometacina, viene attivato il percorso di segnalazione NF-kB. NF-kB, è un eterodimero dei polipeptidi p50 e RelA (p65), che regola l'espressione genica, sia per quanto riguarda la crescita cellulare sia i percorsi apoptotici. Aspirina, sulindac, sulindac solfone, e indometacina provocano lo spostamento della subunità RelA (p65) nel nucleolo, inducendo una risposta apoptotica

nei tumori colonrettali. Tali risposte sono state dimostrate dalla colocalizzazione di RelA con la fibrillina o la nucleolina utilizzando la microscopia confocale associata a tecniche immunocitochimiche.



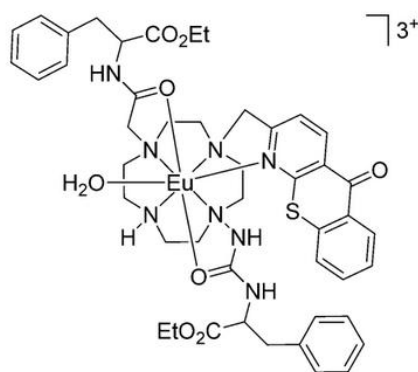
4. Avrainvillamide

E' un alcaloide naturale, (+)-avrainvillamide, che innesca processi antiproliferativi e apoptotici nelle cellule. L'alcaloide è stato contrassegnato in modo fluorescente con una porzione dansyl in uso nella microscopia a fluorescenza. Il composto è stato trovato accumularsi nei nucleoli e nel citoplasma del cancro cervicale HeLa-S3 e nelle cellule umane tumorali epiteliali del seno T-47D. Inoltre, la co-localizzazione è osservata mediante la fluorescenza della nucleofosmina, una proteina nucleolare espressa in molti tumori, correlata alla tumorigenesi. La nucleofosmina, che si trova principalmente nel GC del nucleolo, ha mostrato funzioni che comportano la stimolazione della trascrizione rDNA, il trattamento di pre-rRNA, sia come modulatore positivo che negativo di apoptosi mediata da p53 a seconda del tipo di cellula e di stimolo. Studi più recenti hanno dimostrato che il composto è in grado di legarsi all'atomo di zolfo di Cys275 nella nucleofosmina, il che potrebbe spiegare la sua co-localizzazione e i suoi effetti antiproliferativi.



5. Complesso europio-azatioxantone

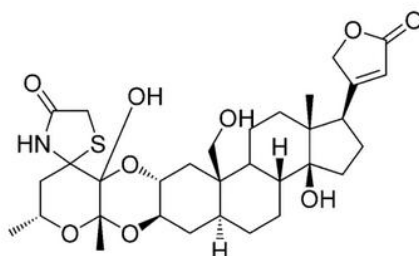
Grazie alle loro proprietà fotofisiche favorevoli, i complessi lantanidi (III) sono particolarmente adatti come sonde molecolari. Se dotati di una frazione sensibilizzante sufficiente per superare la loro bassissima capacità di assorbimento molare, questi complessi metallici sono in grado di produrre strette bande spettrali e alti rapporti segnale/rumore nelle spettroscopie ottiche. Un tale complesso, come quello EuIII con una porzione sensibilizzante azatioxantone, pare sia capace di localizzare i nucleoli delle cellule. Questo complesso ha dimostrato di non essere citotossico a 100 micromoli, di entrare nelle cellule con mezzi diversi dall'endocitosi, e di co-localizzare mediante il colorante SYTO-RNA-Select (vedi sotto), rendendolo una sonda ideale per la localizzazione nucleolare. Il complesso è stato testato in NIH 3T3 (fibroblasti standard), cellule HeLa (cellule di carcinoma cervicale umano endoteliale) e cellule HDF (fibroblasti cutanei umani non trasformati). Nelle cellule NIH 3T3, l'intensità di fluorescenza nel nucleolo è risultata essere tre volte superiore a quella nel citoplasma.



di circa 2,5 volte maggiore rispetto a quella del nucleo e circa 10 volte rispetto al citoplasma.

8. UNBS1450

UNBS1450, un cardenolide semi-sintetico, è capace di modificare la forma e la localizzazione delle proteine del nucleolo nelle cellule tumorali umane. Confrontano l'organizzazione nucleolare di cellule trattate con 100 nm UNBS1450 tramite l'immunofluorescenza, nelle cellule polmonari umane e nei fibroblasti normali non è stato visualizzato alcun cambiamento, mentre nei carcinomi pancreatici DU145 e PC-3 i cambiamenti sono stati marcati nella organizzazione nucleolare. In accordo con questa osservazione, i livelli di espressione del fattore di legame up-stream (UBF) diminuiscono notevolmente nell'arco di 24 h nelle cellule PC-3. UNBS1450 mostra un valore nanomolare basso IC₅₀ nelle cellule PC-3, e un miglioramento di 100 volte circa rispetto all'oxaliplatino, all'irinotecano e l'etoposide. In vivo, i topi affetti dal tumore PC-3 mostrano un aumento del tasso di sopravvivenza dal 36 al 77% quando viene loro iniettato a 10 e 20 mg kg⁻¹ i.p., rispettivamente cinque iniezioni alla settimana per sei settimane.



9. Nanoparticelle

Le nanoparticelle (NP) sono attualmente in fase di sviluppo per una varietà di applicazioni differenti comprese quelle in campo biomedico. Recenti studi suggeriscono che alcune NP possono traslocare verso il nucleo, di tanto in tanto verso il nucleolo. Poli (etilenglicole) rivestito da nanotubi di carbonio a parete singola (SWCNTs) sono stati etichettati attraverso la fluoresceina, e il loro assorbimento e distribuzione cellulare monitorato da microscopia a fluorescenza time-lapse. I nanotubi hanno mostrato un accumulo cellulare specifico nei nucleoli delle varie cellule tumorali, pur non perturbando la loro morfologia. È interessante notare inoltre che la localizzazione nucleolare di queste particelle è reversibile, e la redistribuzione nel nucleoplasma e nel citoplasma ha avuto luogo quando le nanoparticelle sono state rimosse dal supporto di coltura cellulare. Analogamente, le microsfele NP coniugate al peptide Tat, una porzione della proteina Tat del HIV-1, si accumulano in maniera significativa nei nucleoli delle cellule HeLa permeabilizzate. I nanocomposti costituiti da nanoparticelle di TiO₂ e oligonucleotidi contenenti sequenze corrispondenti a rDNA si sono localizzati nel nucleolo con un assorbimento simile ai soli oligonucleotidi. In contrasto con gli esempi precedenti, le NP SiO₂ fluorescenti non sono state localizzate nel nucleolo; tuttavia, sono state influenzate da una redistribuzione temporale della proteina nucleolare Topo I.

10. Peptidi come bersaglio nucleolare

I peptidi come bersaglio nucleolare sono una famiglia di peptidi cellula-penetranti (CPP) che sono in grado di colpire e localizzare i nucleoli delle cellule. Una tale sequenza peptidica, NrTP1 (YKQCHKKGKKGSG), è stata etichettata mediante la fluorescenza al terminale N e incubato con le cellule HeLa, l'adenocarcinoma

pancreatico (BxPC-3), il carcinoma duttale della ghiandola mammaria, (BT-474) e le cellule del neuroblastoma murino (N2A). In tutti i casi, eccetto per le cellule N2A, è stato dimostrato che, mediante la microscopia confocale, NrTP1 si accumula nei nucleoli delle cellule, indipendentemente dalla fase del ciclo cellulare. È stato osservato inoltre che il polipeptide è stato assorbito dalle cellule in dipendenza dalla dose di clatrina-mediata per endocitosi. E' stato dimostrato mediante microscopia confocale un altro CPP marcato dalla fluoresceina b3-octaarginina che si localizza nei nucleoli degli eritrociti infettati da Plasmodium falciparum; tuttavia, non è stato in grado di penetrare negli eritrociti sani e intatti. Queste proprietà potrebbero portare allo sviluppo di nuovi composti farmaceutici di CPP che trasportano selettivamente il farmaco verso le cellule infette (o maligne).

4.6 Discussione

Il ruolo del nucleolo nel sostenere la crescita delle cellule offre un'opportunità interessante per l'intervento chemioterapico. E' stato identificata una gamma diversificata di molecole che colpiscono questa struttura sub-nucleare, direttamente o che influenzano le sue funzioni in qualche modo indiretto. Questi includono intercalanti del DNA, leganti del solco minore, metallanti e alchilanti elettrofili, così come gli agenti ibridi che combinano molteplici modalità vincolanti. Tuttavia, la gamma di molecole nucleolo-mirata non è limitata agli agenti interagenti con il DNA. Antimetaboliti, inibitori della chinasi, farmaci anti-infiammatori, antibiotici prodotti naturali, oligopeptidi, nonché particelle nanometriche, mostrano anche proprietà specifiche in relazione al nucleolo. Tra gli agenti diretti sull'acido nucleico, i composti che inibiscono selettivamente la trascrizione dei geni rRNA (rDNA), sono particolarmente promettenti e hanno dimostrato un certo successo clinico iniziale. Le

ripetizioni in tandem di rDNA (45S gene) sono ricche di G e quindi sono un target "naturale" ad alta affinità con molti agenti elettrofili (platini, mitomicina, ecc.). Una sfida importante nella progettazione di leganti al DNA diretti al nucleolo è quella di dotare queste molecole di alcune proprietà che permettessero una selettività maggiore in relazione a questa struttura risparmiando le sequenze di contenuti base simili all'interno della cromatina circostante. Un approccio particolarmente promettente in questo senso è quello di progettare molecole che riconoscano e si leghino a strutture di acido nucleico non-duplex (CX-3543, CX-5461, naftalene diimide), come le sequenze G-quadruplex, abbondanti nelle copie del gene 45S. Oltre alla progettazione di tali farmacofori, potrebbe esserci l'occasione di riproporre agenti citotossici clinici e sperimentali esistenti come le terapie nucleolo-dirette su base vettoriale (peptidi, nanoparticelle). Questi includono elettrofili chimicamente promiscui e DNA leganti aspecifici che mostrano entrambi effetti collaterali sfavorevoli o che sono stati esclusi interamente essendo eccessivamente tossici per un uso clinico. Infine, un altro caso rilevante potrebbe essere fornito dal targeting del nucleolo tramite agenti che producono addotti permanenti nel DNA. A differenza degli addotti del DNA genomico trascritti dalla RNA polimerasi II, il danno nucleolare del rDNA non è efficacemente rimosso dalla riparazione per escissione di nucleotidi (NER). NER è una forma importante di riparazione (di addotti di DNA e legami interni clinicamente rilevante e farmaco-indotta) ed è un mediatore e un biomarcatore di resistenza tumorale. In conclusione, la diversa natura delle molecole che agiscono sul nucleolo della cellula offre una potente piattaforma per la progettazione di terapie che superano molti degli inconvenienti connessi alle chemioterapie attuali.

CONCLUSIONI

Tradizionalmente il contributo del nucleolo nella tumorigenesi era in gran parte centrato sul suo ruolo che giocava nel facilitare la biogenesi dei ribosomi e la capacità proliferativa, studi più contemporanei dimostrano che il nucleolo probabilmente gioca un ruolo molto più ampio nella trasformazione maligna. In particolare, le funzioni supplementari ribosomali del nucleolo come integratore centrale di stress cellulare stanno emergendo come nuovi meccanismi con cui oncogeni e soppressori tumorali possono modulare le proprie funzioni in cellule normali e maligne. L'elevata dipendenza di alcune cellule tumorali dai processi nucleolari per mantenere il loro fenotipo tumorale è stato chiaramente dimostrato mediante l'applicazione di piccoli inibitori della molecola di Pol I selettivamente ad alcune cellule tumorali in vivo.

Un aspetto importante per quanto riguarda la struttura e la funzione del nucleolo sono le differenze morfologiche presenti tra cellule somatiche normali e cellule neoplastiche. È stato ben stabilito che un aumento della trascrizione del rRNA, come ha luogo nella replicazione accelerata delle cellule, comporta un aumento considerevole delle dimensioni del nucleolo. Questo rapporto è ancora più evidente se il gene soppressore tumorale p53 è mutato o assente, ciò comporta la formazione di grandi nucleoli ipertrofici. In particolare, le mutazioni di p53 sono presenti in più del 50% di tutti i tumori umani. I nucleoli ingrossati supportano una rapida crescita delle cellule tumorali. Poiché i nucleoli persistono in tutte le fasi di crescita del ciclo cellulare, la down-modulation della sintesi del rRNA può essere considerata un modo diretto di inibire il potenziale proliferativo di cellule tumorali. L'interruzione della trascrizione e dell'elaborazione di rRNA, così come altre forme di stress nucleolare, può portare ad un

arresto del ciclo cellulare e alla morte cellulare programmata in fase G1 o G2. Questo include percorsi p53-mediati in cellule con p53 funzionale. Un altro percorso importante che coinvolge la proteina retinoblastoma (pRb) sembra influenzare la trascrizione dell'RNA e l'ipertrofia nucleolare. I tumori con p53 e pRb inattivi sono caratterizzati da una maggiore aggressività e una prognosi più negativa. Inoltre, i percorsi Myc e PI3K-AKT-mTOR hanno mostrato un meccanismo di cooperazione per la promozione della biogenesi del ribosoma. Di conseguenza, quando questi percorsi sono iperattivi, sono più propensi a portare a forme più aggressive e resistenti di cancro. Dall'evidente cambiamento nelle dimensioni del nucleolo osservato nella carcinogenesi, i farmaci che mirano al nucleolo hanno la capacità di produrre un impatto immediato e dannoso sulle cellule tumorali, pur risparmiando un numero maggiore di cellule normali. Infatti è probabile che si sia solo cominciato a graffiare la superficie del potenziale del nucleolo come un nuovo target per la terapia del cancro.

Prospettive future.

Idealmente, i regimi di trattamento del cancro dovrebbero essere basati sull'integrità dei percorsi cellulari, e i nucleoli forniscono un'importante apertura alla risposta delle cellule allo stress. Ad esempio il nucleolo subisce modifiche specifiche nella composizione e nella struttura in risposta agli agenti chemioterapici che danneggiano il DNA cellulare, incluso il rilascio di proteine che regola il soppressore tumorale p53. Dunque, una risposta atipica del nucleolo alla chemioterapia può essere utilizzata per identificare dei problemi nel percorso di p53 nel caso in cui non siano stati identificati altri cambiamenti evidenti. Il nucleolo rappresenta perciò un potenziale biomarcatore

per alcuni cambiamenti funzionali nel percorso molecolare associato alla soppressione tumorale. Inoltre i cambiamenti della funzione tumorale possono essere utilizzati per monitorare la risposta al trattamento e, se utilizzati nelle biopsie e nelle analisi ex-vivo, come criterio di selezione del più efficace trattamento cancerogeno per ciascun paziente.

Per concludere, il numero dei nucleoli, la loro morfologia e la loro composizione biochimica influenza l'intera salute cellulare e l'integrità dei percorsi coinvolti nel processo di progressione delle cellule, nella risposta delle cellule allo stress, nel mantenimento dell'integrità genetica e nella soppressione tumorale.

L'utilità dei nucleoli nelle patologie cancerose non è più ristretta al contesto AgNOR e alle dimensioni nucleolari. Oggigiorno troviamo infatti un insieme (in rapida espansione) di proteine nucleolari associate che agiscono da biomarcatori per la diagnosi e la prognosi del cancro, oltre che per la scelta del tipo di trattamento e di monitoraggio.

BIBLIOGRAFIA

- C.E. Nesbit, J.M. Tersak, E.V. Prochownik, MYC oncogenes and human neoplastic disease, *Oncogene* 18 (1999) 3004–3016.
- C.V. Dang, MYC on the path to cancer, *Cell* 149 (2012) 22–35.
- C.V. Dang, c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1–11.
- Q.M. Guo, et al., Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray, *Cancer Res.* 60 (2000) 5922–5928.
- J.H. Patel, A.P. Loboda, M.K. Showe, L.C. Showe, S.B. McMahon, Opinion — analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 562–568.
- C.V. Dang, et al., The c-Myc target gene network, *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 253–264.
- N. Meyer, L.Z. Penn, MYC — timeline reflecting on 25 years with MYC, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 976–990.
- D. Ruggero, The role of Myc-induced protein synthesis in cancer, *Cancer Res.* 69 (2009) 8839–8843.
- G. Poortinga, K.M. Hannan, H. Snelling, C.R. Walkley, A. Jenkins, K. Sharkey, M. Wall, Y. Brandenburger, M. Palatsides, R.B. Pearson, G.A. McArthur, R.D. Hannan, MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation, *EMBO J.* 23 (2004) 3325–3335.
- G. Poortinga, M. Wall, E. Sanij, K. Siwicki, J. Ellul, D. Brown, T.P. Holloway, R.D. Hannan, G.A. McArthur, c-MYC coordinately regulates ribosomal gene chromatin remodeling and Pol I availability during granulocyte differentiation, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 3267–3281.
- S.S. Grewal, L. Li, A. Orian, R.N. Eisenman, B.A. Edgar, Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 295–302.
- C. Grandori, N. Gomez-Roman, Z.A. Felton-Edkins, C. Ngouenet, D.A. Galloway, R.N. Eisenman, R.J. White, c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 311–U121.
- A. Arabi, S.Q. Wu, K. Ridderstrale, H. Bierhoff, C. Shiue, K. Fatyol, S. Fahlen, P. Hydbring, O. Soderberg, I. Grummt, L.G. Larsson, A.P.H. Wright, c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 303–310.
- C.N. Shiue, R.G. Berkson, A.P. Wright, c-Myc induces changes in higher order rDNA structure on stimulation of quiescent cells, *Oncogene* 28 (2009) 1833–1842.
- K.I. Zeller, T.J. Haggerty, J.F. Barrett, Q.B. Guo, D.R. Wonsey, C.V. Dang, Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48285–48291.
- I. Schlosser, M. Holzel, M. Murnseer, H. Burtcher, U.H. Weidle, D. Eick, A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 6148–6156.
- N. Gomez-Roman, et al., Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc, *Nature* 421 (2003) 290–294.
- N. Gomez-Roman, Z.A. Felton-Edkins, N.S. Kenneth, S.J. Goodfellow, D. Athineos, J.X. Zhang, B.A. Ramsbottom, F. Innes, T. Kantidakis, E.R. Kerr, J. Brodie, C. Grandori, R.J. White, Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III, in: *Transcription*, 2006. 141–154.
- J. van Riggelen, A. Yetil, D.W. Felsher, MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 301–309.
- S.A.S. Johnson, L. Dubeau, M. Kawalek, A. Dervan, A.H. Schonthal, C.V. Dang, D.L. Johnson, Increased expression of TATA-binding protein, the central transcription factor, can contribute to oncogenesis, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 3043–3051.
- J. Zhao, X.J. Yuan, M. Frodin, I. Grummt, ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth, *Mol. Cell* 11 (2003) 405–413.
- C. Mayer, H. Bierhoff, I. Grummt, The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis, *Genes Dev.* 19 (2005) 933–941.
- V.Y. Stefanovsky, T. Moss, The splice variants of UBF differentially regulate RNA polymerase I transcription elongation in response to ERK phosphorylation, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5093–5101.
- K.M. Hannan, Y. Brandenburger, A. Jenkins, K. Sharkey, A. Cavanaugh, L. Rothblum, T. Moss, G. Poortinga, G.A. McArthur, R.B. Pearson, R.D. Hannan, mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 8862–8877.

- C. Mayer, J. Zhao, X.J. Yuan, I. Grummt, mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-1A links rRNA synthesis to nutrient availability, *Genes Dev.* 18 (2004) 423–434.
- C. Zhang, L. Comai, D.L. Johnson, PTEN represses RNA polymerase I transcription by disrupting the SL1 complex, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 6899–6911.
- J.C. Chan, K.M. Hannan, K. Riddell, N. Pui Yee, A. Peck, R.S. Lee, S. Hung, M.V. Astle, M. Bywater, M. Wall, G. Poortinga, K. Jastrzebski, K.E. Sheppard, B.A. Hemmings, M.N. Hall, R.W. Johnstone, G.A. McArthur, R.D. Hannan, R.B. Pearson, AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer, *Sci. Signal.* 4 (2011).
- R. Sears, G. Leone, J. DeGregori, J.R. Nevins, RAS enhances Myc protein stability, *Mol. Cell* 3 (1999) 169–179.
- Y. Pylyayeva-Gupta, E. Grabocka, D. Bar-Sagi, RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 761–774.
- A. Takashima, D. Faller, Targeting the RAS oncogene, *Expert Opin. Ther. Targets* 17 (2013) 507–531.
- J.K. Osborne, E. Zaganjor, M.H. Cobb, Signal control through Raf: in sickness and in health, *Cell Res.* 22 (2012) 14–22.
- C. Blanco-Aparicio, et al., PTEN, more than the AKT pathway, *Carcinogenesis* 28 (2007) 1379–1386.
- S. Zhang, D. Yu, PI(3)K apart PTEN's role in cancer, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 4325–4330.
- Y. Samuels, Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S.M. Powell, G.J. Riggins, J.K.V. Willson, S. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science* 304 (2004) 554.
- K. Jastrzebski, Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function, *Growth Factors* 25 (2007) 209–226.
- Y. Martineau, et al., Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins, *Oncogene*, 671-7, 2013.
- T.L. Yuan, L.C. Cantley, PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme, *Oncogene* 27 (2008) 5497–5510.
- K. Sheppard, et al., Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signalling in cancer, *Crit. Rev. Oncog.* 17 (2012) 69–95.
- Y.P. Zhang, Y. Xiong, W.G. Yarbrough, ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways, *Cell* 92 (1998) 725–734.
- C.J. Sherr, Divorcing ARF and p53: an unsettled case, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 663–673.
- A. Carnero, J.D. Hudson, C.M. Price, D.H. Beach, p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 148–155.
- J.D. Weber, J.R. Jeffers, J.E. Rehg, D.H. Randle, G. Lozano, M.F. Roussel, C.J. Sherr, G.P. Zambetti, p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor, *Genes Dev.* 14 (2000) 2358–2365.
- K.H. Vousden, X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 594–604.
- N.E. Sharpless, INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 576 (2005) 22–38.
- Pianese G: Beitrag zur Histologie und Aetiologie der Carcinoma. Histologische und experimentelle Untersuchungen. *Beitr Pathol Anat Allgem Pathol* 1896, 142:1–193
- Busch H, Smetana K: The Nucleolus. New York, Academic Press, 1970
- Hadjiolov AA: The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biology Monographs*, vol 12. Vienna, Springer Verlag, 1985, pp 1–267
- Derenzini M, Ploton D: Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol* 1991, 32:149–192
- Conlon I, Raff M: Size control in animal development. *Cell* 1999, 96:235–24
- Libbrecht L, Desmet V, Roskams T: Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver Int* 2005, 25:16–17
- Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO: Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002, 13: 1929–1939
- Derenzini M, Trere D, Oliveri F, David E, Colombatto P, Bonino F, Brunetto MR: Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease? *J Clin Pathol* 1993, 46:727–729
- D, Borzio M, Morabito A, Borzio F, Roncalli M, Derenzini M: Nucleolar hypertrophy correlates with hepatocellular carcinoma development in cirrhosis due to HBV infection. *Hepatology* 2003,37:72–78

- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL: Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998, 18:7086–7094
- Aufiero B, Schneider RJ: The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990, 9:497–504
- Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J: Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology* 2005, 41:1096–1105
- Kawamura H, Govindarajan S, Aswad F, Machida K, Lai MM, Sung VM, Dennert G: HCV core expression in hepatocytes protects against autoimmune liver injury and promotes liver regeneration in mice. *Hepatology* 2006, 44:936–944
- Kao CF, Chen SY, Lee YH: Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. *J Biomed Sci* 2004, 11:72–94
- Cougot D, Neuveut C, Buendia MA: HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 2005, 34(Suppl 1):S75–S78
- Koike K: Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepato-carcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005, 3:S132–S135
- Lee RG, Tsamandas AC, Demetris AJ: Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis. *Hepatology* 1997, 26:1415–1422
- Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N: Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 1990, 345:544–547
- Montanaro L, Pandolfi PP: Initiation of mRNA translation in oncogenesis: the role of eIF4E. *Cell Cycle* 2004, 3:1387–1389
- Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP: The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 2004, 10:484–486
- Dokal I: Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000, 110:768–779
- Wang C, Query CC, Meyer UT: Immunopurified small nucleolar ribonucleoprotein particles pseudouridylate rRNA independently of their association with phosphorylated Nopp140. *Mol Cell Biol* 2002, 22:8457–8466
- Mitchell JR, Wood E, Collins K: A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999, 402:551–555
- Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, Rego E, Mari F, Rao PH, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP: Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* 2003, 299:259–262
- Wong JM, Kollins K: Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev* 2006, 20:2848–2858
- Montanaro L, Tazzari PL, Derenzini M: Enhanced telomere shortening in transformed lymphoblasts from patients with X linked dyskeratosis. *J Clin Pathol* 2003, 56:583–586
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorf PM, DePinho RA, Greider CW: Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997, 91:25–34
- He J, Navarrete S, Jasinski M, Vulliamy T, Dokal I, Bessler M, Mason PJ: Targeted disruption of Dkc1, the gene mutated in X-linked dyskeratosis congenita, causes embryonic lethality in mice. *Oncogene* 2002, 21:7740–7744
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D: Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 2006, 312:902–906
- Montanaro L, Brigotti M, Clohessy J, Barbieri S, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Calienni M, Teruya-Feldstein J, Trere D, Pandolfi PP, Derenzini M: Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. *J Pathol* 2006, 210:10–18
- Draptchinskaya N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N: The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999, 21:169–175
- ger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawalibi R, Alvarez-Arias DA, Gas N, Bertolone SJ, Gleizes PE, Elliss SR: Specific role for yeast homologs of the Diamond Blackfan anemia associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *J Biol Chem* 2005, 280:38177–38185
- Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, Vlachos A, Atsidaftos E, Ball SE, Orfali KA, Niewiadomska E, Da Costa L, Tchernia G, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Stahl J, Schrott G, Glader B, Backer K, Wong C, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA: Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2006, 79:1110–1118
- Chu S, Archer RH, Zengel JM, Lindahl L: The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:659–663

- Hermanns P, Bertuch AA, Bertin TK, Dawson B, Schmitt ME, Shaw C, Zabel B, Lee B: Consequences of mutations in the non coding RMRP RNA in cartilage-hair hypoplasia. *Hum Mol Genet* 2005, 14:3723–3740
- Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, Rommens JM: Mutations in SBDS are associated with Shwachman- Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003, 33:97–101
- Boocock GR, Marit MR, Rommens JM: Phylogeny, sequence conservation, and functional complementation of the SBDS protein family. *Genomics* 2006, 87:758–771
- Menne TF, Goyenechea B, Sanchez-Puig N, Wong CC, Tonkin LM, Ancliff PJ, Brost RL, Costanzo M, Boone C, Warren AJ: The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* 2007, 39:486–495
- The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group, Dixon J, Edwards SJ, Gladwin AJ, Dixon MJ, Loftus SK, Bonner CA, Koprivnikar K, Wasmuth JJ: Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins Syndrome. *Nature Genet* 1996, 12:130–136
- Valdez BC, Henning D, So RB, Dixon J, Dixon MJ: The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:10709–10714
- Gonzales B, Henning D, So RB, Dixon J, Dixon MJ, Valdez BC: The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation. *Hum Mol Genet* 2005, 14:2035–2043
95. Stewart MJ, Denell R: Mutations in the *Drosophila* gene encoding ribosomal protein S6 cause tissue overgrowth. *Mol Cell Biol* 1993, 13:2524–2535
- Watson KL, Konrad KD, Woods DF, Bryant PJ: *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 11302–11306
- Amsterdam A, Sadler KC, Lai K, Farrington S, Bronson RT, Lees JA, Hopkins N: Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* 2004, 2:E139
- Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi PP: Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 2005, 437:147–153
99. Wool IG: Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 1996, 21:164–165
- Chen FW, Ioannu IA: Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol* 1999, 18:429–448
- Hadjiolov AA: The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biology Monographs*. Wien, New York, Springer, 1995, pp 1-267
- Busch H, Smetana K: Nucleoli oftumor cels.The Nucleolus. Edited by Busch H, Smetana K. New York, London, Academic Press, 1970, pp 448-471
- Pianese G: Beitrag zur Histologie und Aetiologie der Carcinoma. *Histologische und experimentelle Untersuchungen. Beitr Pathol Anat Aligem Pathol* 1896, 142(suppl 1):1-193
- HowellWM: Selectivestainingofnucleolusorganizerregions(NORs). *The Cell Nucleus*. Edited by Busch H, Rothblum L. New York, Academic Press, 1982, pp 89-112
- Olson MOJ: The role of proteins in nucleolar structure and function. *The Eukaryotic Nucleolus: Molecular Biochemistry and Macromolecular Assemblies*. Edited by Strauss PR, Wilson SH. Cadwell, New York, Telford Press Inc, 1990, pp 519-559
- Pession A, Farabegoli F, Trerb D, Novello F, Montanaro L, Sperti S, Rambelli F, Derenzini M: The Ag-NOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cel nuclei. *Chromosoma* 1991, 100:242-250
- Derenzini M, SiriV, Pession A, Trere D, Roussel P, Ochs RL, Hernandez-Verdun D: Quantitative changes of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23, are related to stimulation of rDNA transcription.*ExpCellRes* 1995,219:276-282
- SiriV,RousselP,GendronMC,Hernandez-VerdunD:Amountofthe two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 1997, 28:147-156
- Trere D, Pession A, Derenzini M: The silver-stained proteins of interphasicnucleolarorganizerregionsasaparameterofcelduplication rate. *Exp Cell Res* 1989, 184:131-137
- Derenzini M, Pession A, Trere D: The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells.*Lab Invest* 1990, 63:137-140
- Ofner D, Hittmair A, Marth CR, Ofner C, Totsch M, Daxenbichler G, Mikuz G, Margreiter R, Schmid KW: Relationship between quantity of silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag- NORs)and population doubling time intenbreast cancer cellines. *Pathol Res Pract* 1992, 188:742-746
- Stirpe F, Novello F: Effect on ionic strength, spermine and divalent ions with native and denatured deoxyribonucleic acid. *Eur J Biochem* 1970, 15:505-512
- LiuLF,MillerKG:Eukaryotic DNA topoisomerases: two form softype DNA topoisomerases from HeLa cel nuclei. *ProcNatlAcadSciUSA* 1981, 78:3487-3491

- Ochs RL, Lischwe MA, Spohn WH, Busch H: Fibrilarin, a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 1985, 54: 123-134
- Moss T, Stefanovsky VY: Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995, 50:25-66
- Larson DE, Zahradka P, Sells BH: Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol* 1991, 69:5-22
- Glibetic M, Taylor L, Larson D, Hannan R, Sells B, Rothblum L: The RNA polymerase transcription factor UBF is the product of a primary response gene. *J Biol Chem* 1995, 270:4209-4212
- Kass S, Tyc K, Steitz JA, Sollner-Webb B: The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 1990, 60:897-908
- Muller MT, Pfund WP, Metha VB, Trask DK: Eukaryotic type topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal RNA. *EMBO J* 1985, 4:1237-1243
- Zhang H, Wang JC, Liu LF: Involvement of DNA topoisomerase in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:1060-1064
- Buckwalter CA, Lin AH, Tanizawa A, Pommier YG, Cheng YC, Kaufmann SH: RNA synthesis inhibitors alter the subnuclear distribution of DNA topoisomerase I. *Cancer Res* 1996, 56:1674-1681
- Derenzini M, Farabegoli F, Trere D: Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells. *Histochem J* 1992, 24:951-956
- Ofner D, Bankflavi A, Riehemann K, Bier B, Bocker B, Schmid KW: Wet autoclave pretreatment improves the visualization of silver-stained nucleolar organizer-region-associated proteins in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 1994, 7:946-950
- T. Douset, C. Wang, C. Verheggen, D. Y. Chen, D. Hernandez-Verdun, S. Huang, *Mol. Biol. Cell* 2000, 11, 2705 – 2717.
- J. E. Wulff, R. Siegrist, A. G. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 14444 – 14451.
- M. S. Lindstrom, *Biochem. Res. Int.* 2011, 195209.
- E. Colombo, M. Alcalay, P. G. Pelicci, *Oncogene* 2011, 30, 2595 – 2609.
- C. G. Grummitt, F. M. Townsley, C. M. Johnson, A. J. Warren, M. Bycroft, *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 23326 – 23332.
- C. J. Thomas, N. J. Rahier, S. M. Hecht, *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 1585 – 1604.
- C. Pondarre, D. Strumberg, A. Fujimori, R. Torres-Leon, Y. Pommier, *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4111 – 4116.
- Y. Y. Mo, Y. Yu, Z. Shen, W. T. Beck, *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 2958 – 2964.
- M. O. Christensen, H. U. Barthelmes, S. Feineis, B. R. Knudsen, A. H. Andersen, F. Boege, C. Mielke, *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 15661–15665.
- O. Bensaude, *Transcription* 2011, 2, 103 – 108.
- K. Burger, B. Muhl, T. Harasim, M. Rohrmoser, A. Malamoussi, M. Orban, M. Kellner, A. Gruber-Eber, E. Kremmer, M. Helzel, D. Eick, *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 12416 – 12425.
- P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2831 – 2836.
- M. Horky, G. Wurzer, V. Kotala, M. Anton, B. Vojtesek, J. Vacha, J. Wesierska-Gadek, *J. Cell Sci.* 2001, 114, 663 – 670.
- D. Drygin, A. Siddiqui-Jain, S. O'Brien, M. Schwaebe, A. Lin, J. Bliesath, C. B. Ho, C. Proffitt, K. Trent, J. P. Whitten, J. K. Lim, D. Von Hoff, K. Anderes, W. G. Rice, *Cancer Res.* 2009, 69, 7653 – 7661.
- S. Balasubramanian, L. H. Hurley, S. Neidle, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2011, 10, 261 – 275.
- M. J. Bywater, G. Poortinga, E. Sanij, N. Hein, A. Peck, C. Cullinane, M. Wall, L. Cluse, D. Drygin, K. Anderes, N. Huser, C. Proffitt, J. Bliesath, M. Haddach, M. K. Schwaebe, D. M. Ryckman, W. G. Rice, C. Schmitt, S. W. Lowe, R. W. Johnstone, R. B. Pearson, G. A. McArthur, R. D. Hannan, *Cancer Cell* 2012, 22, 51 – 65.
- D. Drygin, A. Lin, J. Bliesath, C. B. Ho, S. E. O'Brien, C. Proffitt, M. Omori, M. Haddach, M. K. Schwaebe, A. Siddiqui-Jain, N. Streiner, J. E. Quin, E. Sanij, M. J. Bywater, R. D. Hannan, D. Ryckman, K. Anderes, W. G. Rice, *Cancer Res.* 2011, 71, 1418 – 1430.
- C. Bailly, C. Michaux, P. Colson, C. Houssier, J. S. Sun, T. Garestier, C. Helene, J. P. Henichart, C. Rivalle, E. Bisagni, M. J. Waring, *Biochemistry* 1994, 33, 15348 – 15364.
- C. Bailly, V. Leclere, N. Pommery, P. Colson, C. Houssier, C. Rivalle, E. Bisagni, J. P. Henichart, *Anticancer Drug Des.* 1993, 8, 145 – 164.
- J. N. A. Tettey, G. G. Skellern, J. M. Midgley, M. H. Grant, R. Wilkinson, A. R. Pitt, *Xenobiotica* 1999, 29, 349 – 360.

- H. Zhao, J. Oczos, P. Janowski, D. Trembecka, J. Dobrucki, Z. Darzynkiewicz, D. Wlodkowic, *Cytometry Part A* 2010, 77, 399 – 405.
- C. P. Montgomery, B. S. Murray, E. J. New, R. Pal, D. Parker, *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 925-937.
- J. H. Yu, D. Parker, R. Pal, R. A. Poole, M. J. Cann, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2294 – 2299.
- M. Beljanski, *Genet. Mol. Biol.* 2000, 23, 29 – 33.
- M. Beljanski, S. Crochet, *Int. J. Oncol.* 1995, 7, 81 – 85.
- D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 330 –338.
- S. R. Lynch, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* 2001, 306, 1023 – 1035.
- S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *EMBO J.* 1998, 17, 6437 – 6448.
- S. Wu, X. Wang, C. Zhu, Y. Song, J. Wang, Y. Li, Z. Guo, *Dalton Trans.* 2011, 40, 10376 – 10382.
- R. G. Snodgrass, A. C. Collier, A. E. Coon, C. A. Pritsos, *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 19068 – 19075.
- J. Cheng, K. A. Fernando, L. M. Veca, Y. P. Sun, A. I. Lamond, Y. W. Lam, S. H. Cheng, *ACS Nano* 2008, 2, 2085 – 2094.
- N. Nitin, L. LaConte, W. J. Rhee, G. Bao, *Ann. Biomed. Eng.* 2009, 37, 2018 – 2027.
- T. Paunesku, S. Vogt, B. Lai, J. Maser, N. Stojicevic, K. T. Thurn, C. Osipo, H. Liu, D. Legnini, Z. Wang, C. Lee, G. E. Woloschak, *Nano Lett.* 2007, 7, 596 – 601.
- F. Cuenca, O. Greciano, M. Gunaratnam, S. Haider, D. Munnur, R. Nanjunda, W.D. Wilson, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1668–1673.
- G. Rüdiger-Baptista, B. G. de La Torre, D. Andreu, *Chem. Biol. Drug Des.* 2012, 79, 907 – 915.
- F. Kamena, B. Monnanda, D. Makou, S. Capone, K. Patora-Komisarska, D. Seebach, *Chem. Biodiversity* 2011, 8, 1 – 12.
- C. J. Loveridge, A. D. H. MacDonald, H. C. Thoms, M. G. Dunlop, L. A. Stark, *Oncogene* 2008, 27, 2648 – 2655.
- L. A. Stark, M. G. Dunlop, *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 5985 – 6004.
- J. Suryadi, U. Bierbach, *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 12926 – 12934.
- S. Ding, X. Qiao, J. Suryadi, G. S. Marrs, G. L. Kucera, U. Bierbach, *Angew. Chem.* 2013, 125, 3434 – 3438 ; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 3350 –3354.
- S. Ding, X. Qiao, G. L. Kucera, U. Bierbach, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 10198 – 10203.
- L. E. Wedlock, M. R. Kilburn, R. Liu, J. A. Shaw, S. J. Berners-Price, N. P. Farrell, *Chem. Commun.* 2013, 49, 6944 – 6946.
- C. Le Tourneau, S. Faivre, M. Serova, E. Raymond, *Br. J. Cancer* 2008, 99, 1197 – 1203.
- V. Iadevaia, Y. Huo, Z. Zhang, L. J. Foster, C. G. Proud, *Biochem. Soc. Trans.* 2012, 40, 168 – 172.
- The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th ed. (Eds.: I. Johnson, M. T. Z. Spence), Life Technologies Corporation, Carlsbad, 2010.
- T. Mijatovic, N. De Neve, P. Gailly, V. Mathieu, B. Haibe-Kains, G. Bontempi, J. Lapeira, C. Decaestecker, V. Facchini, R. Kiss, *Mol. Cancer Ther.* 2008, 7, 1285 – 1296.
- D. Drygin, W. G. Rice, I. Grummt, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010, 50, 131 – 156.
- F.C.Christians,P.C.Hanawalt,*Biochemistry*1993,32,10512–10518.
- A. S. Balajee, A. May, V. A. Bohr, *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 2511 – 2520. [92] D. J. Stewart, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010, 75, 173 – 234.